

INAUGURAL – DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

Eda Demirel (*Master of Science*)

aus Frankenthal am Rhein

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Mai 2018

---

Der Einfluss von RGS5  
auf den Phänotyp  
arterieller glatter Gefäßmuskelzellen

Gutachter: Prof. Dr. Markus Hecker

Prof. Dr. Marc Freichel

## Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis .....	7
2	Zusammenfassung.....	11
3	Summary.....	13
4	Einleitung.....	15
4.1	Aufbau und Funktion des Herz-Kreislaufsystems .....	15
4.1.1	Hochdruck- und Niederdrucksystem .....	16
4.1.2	Aufbau und Funktion von Arterien .....	17
4.1.3	Kontraktion und Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen .....	18
4.2	Pathophysiologische Veränderung von Blutgefäßen .....	20
4.2.1	Hypertonie .....	20
4.2.2	Neointimabildung .....	23
4.2.3	Phänotypänderung glatter Gefäßmuskelzellen .....	24
4.3	Steuerung von Signalwegen durch G-Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen .....	27
4.3.1	Ausgewählte G-Protein-vermittelte Signalwege.....	30
4.3.2	G-Protein-vermittelte Signalwege in der Neointimabildung .....	31
4.4	Regulation der Aktivität der G $\alpha$ -Untereinheit durch RGS-Proteine.....	32
4.4.1	Einfluss und Vorkommen der B/R4-RGS-Proteinsubfamilie im kardiovaskulären System.....	35
4.4.2	Bedeutung von RGS5 für vaskuläre Remodellierungsprozesse .....	37
4.5	Zielsetzung dieser Doktorarbeit .....	40
5	Material und Methoden .....	42
5.1	Material.....	42
5.1.1	Verbrauchsmaterial.....	42
5.1.2	Geräte .....	48
5.1.3	Zellen.....	49

---

5.1.4	Viren .....	50
5.1.5	DNA und RNA .....	50
5.1.6	Antikörper und Farbstoffe .....	51
5.1.7	Stimulatoren und Inhibitoren .....	52
5.1.8	Restriktionsenzyme.....	53
5.1.9	Präparationsbesteck .....	53
5.1.10	Mauslinien.....	53
5.2	Methoden.....	54
5.2.1	(S1- und S2-) Zellkulturtechniken.....	54
5.2.2	Analyseverfahren kultivierter HUASMCs .....	60
5.2.3	Biomechanische Dehnung glatter Gefäßmuskelzellen .....	68
5.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	68
5.2.5	Proteinbiochemische Methoden .....	73
5.2.6	Fluoreszenzbasierte Analyseverfahren .....	75
5.2.7	Generierung einer CreERT-SMMHC-LSL-RGS5-Maus.....	76
5.2.8	Statistische Auswertung.....	77
6	Ergebnisse.....	78
6.1	Der Einfluss von RGS5 auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen .....	78
6.1.1	<i>In silico</i> -Analyse der RGS5-Expression in humanem Gewebe im Vergleich zu weiteren B/R4 Subfamilienmitgliedern .....	78
6.1.2	Untersuchung des Einflusses von RGS5 auf das Transkriptom glatter Gefäßmuskelzellen.....	79
6.1.3	Analyse des Einflusses von RGS5 auf Markerproteine des kontraktiven Phänotyps .....	82
6.2	Der Einfluss von RGS5 und RGS16 auf die Funktion glatter Gefäßmuskelzellen .....	82
6.2.1	Vergleichende Untersuchung der Wirkung von $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{i/o}$ auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen .....	83
6.2.2	Analyse des Migrationsverhaltens glatter Gefäßmuskelzellen nach RGS5 Überexpression .....	84
6.2.3	Vergleichende Untersuchung der Effekte von RGS5 und RGS16 auf die Migration glatter Gefäßmuskelzellen .....	85

---

6.2.4	Untersuchung des Migrationsverhaltens RGS5-defizienter glatter Gefäßmuskelzellen in Kollagengelen .....	87
6.2.5	Betrachtung des Migrationsverhaltens RGS5-defizienter glatter Gefäßmuskelzellen nach RGS5-Expressionsinduktion.....	88
6.2.6	Untersuchung der $G\alpha_{q/11}$ - bzw. $G\alpha_{i/o}$ -abhängigen Migration glatter Gefäßmuskelzellen.....	89
6.3	Analyse der Effekte von RGS5 und RGS16 in Proliferations- und Migrationsrelevanten Signalkaskaden.....	90
6.3.1	Analyse des Kinasen-Profiles nach RGS5- bzw. RGS16-Überexpression in glatten Gefäßmuskelzellen.....	90
6.3.2	Einfluss von RGS5 bzw. RGS16 auf die ERK1/2-Aktivität .....	95
6.3.3	Untersuchung der ERK1/2-Aktivität in Abhängigkeit von $G\alpha_{q/11}$ bzw. $G\alpha_{i/o}$ .....	96
6.3.4	Untersuchung der ERK1/2-Aktivität in Abhängigkeit von PKC.....	97
6.3.5	Effekte von PKA auf die ERK1/2-Aktivität, Proliferation und Migration in glatten Gefäßmuskelzellen.....	98
6.4	Untersuchung der Rolle von RhoA-GTP in glatten Gefäßmuskelzellen .....	99
6.4.1	Ermittlung des Einflusses der RGS5-Überexpression auf die RhoA-GTP Menge und Stressfaserbildung.....	99
6.4.2	Untersuchung der RhoA Aktivität in Abhängigkeit von $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{i/o}$ .....	102
6.4.3	Untersuchung des Einflusses von Rho-GTP auf die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen .....	103
6.4.4	Untersuchung des Einflusses von RGS5 auf die Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen durch biomechanische Dehnung.....	104
6.4.5	Transkriptomanalyse glatter Gefäßmuskelzellen nach RGS5-Überexpression und biomechanischer Dehnung .....	106
6.5	Generierung der Mauslinie CreERT-SMMHC-LSL-RGS5 zur induzierbaren RGS5-Überexpression in glatten Gefäßmuskelzellen .....	109
6.5.1	Funktionelle Untersuchung der transgenen Mauslinie .....	110
7	Diskussion.....	112
7.1	Der Einfluss von RGS5 und RGS16 auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen.....	112

---

7.2	Der Einfluss von MAP-Kinasen auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen .....	116
7.3	Der Einfluss von RhoA auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen .....	121
7.4	Der Einfluss von RGS5 auf gedehnte glatte Gefäßmuskelzellen .....	123
7.5	Funktionsnachweis der transgenen CreERT-SMMHC-LSL-RGS5-Maus.....	126
7.6	Limitationen und Ausblick.....	129
8	Danksagung .....	131
9	Literaturverzeichnis.....	133

# 1 Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikrometer
α-SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
AC	Adenylatzyklase
ACE	<i>angiotensin-converting enzyme</i>
ActD	Actinomycin D
adPL	Adenovirus-Plasmid (nicht-kodierend)
AKAP	A-Kinase Ankerprotein
Akt	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein Kinase B (PKB)</i>
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	Aktivator-Protein-1
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ARHGEF	<i>rhoa/rac guanosin exchange factor</i>
ARHGAP	Rho GTPase aktivierendes Protein
AT <sub>1</sub>	Angiotensin I Rezeptor
AT <sub>2</sub>	Angiotensin II Rezeptor
ATF-2	<i>cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2</i>
Ang II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bGH	<i>bovine growth hormone</i>
bp	<i>base pairs</i>
c	Konzentration
C/EBP-beta	<i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>
C3-Transferase	<i>ADP ribosyl transferase C3</i>
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
CamKII	<i>calmodulin-dependent protein kinase II</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ccne2	<i>G1/S-specific cyclin-E2</i>
Cdc	<i>cell division control protein</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> bzw. Zyklin
p27 <sup>Kip1</sup>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1 a</i>
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
<i>col11a1</i>	<i>collagen, Type XI, Alpha 1</i>
<i>col14a1</i>	<i>collagen, Type XIV, Alpha 1</i>
CPI-17	<i>C-kinase-activated protein phosphatase-1 (PP1) inhibitor</i>
Cre	<i>Cre (Causes Recombination) recombinase</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
cRNA	<i>coding RNA</i>
C <sub>t</sub>	<i>cycle threshold</i>
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>

dT	Thymidindinucleotide
EZM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
Elk1	<i>ELK1 member of ETS oncogene family</i>
Epac	<i>exchange protein activated by cAMP</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ET <sub>A</sub>	Endothelin A Rezeptor
ET <sub>B</sub>	Endothelin B Rezeptor
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FKS	Fetales Kälberserum
FOXO3a	Forkhead Box O3
FSK	Forskolin
fwd.	<i>forward</i>
Fyn	Tyrosin-Proteinkinase Fyn
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GEF	<i>guanosin nucleotide exchange factor</i>
GMZ	glatte/r/n Gefäßmuskelzellen
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRKs	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen
GSK-3β	<i>glycogen synthase kinase-3 beta</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAoSMCs	human aortic smooth muscle cells
<i>Hb-egf</i>	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HUASMCs	human umbilical arterial smooth muscle cells
i.e.	<i>id est</i>
Il1β	Interleukin-1 beta
Il33	Interleukin-33
Il8	Interleukin-8
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IU	<i>infectious units</i>
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
JunB	<i>junB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Ki-67	<i>Proliferation marker protein Ki-67</i>
Klf-4	<i>Krüppel-like factor-4</i>
Kzk	Kozak
ko	<i>knockout</i>
LARG	<i>leukemia associated RhoGEF</i>
Lck	Tyrosin-Proteinkinase Lck
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i>



LSL	LoxP-Stop-LoxP
Lyn	Tyrosin-Proteinkinase Lck
M	Mol
M199	Medium 199
MAD	mittlerer arterieller Druck
MAoSMC	primäre murine arterielle glatte Gefäßmuskelzellen aus der Aorta
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
max.	maximal
MRTF-A	<i>myocardin-related transcription factor A</i>
MRTF-B	<i>myocardin-related transcription factor B</i>
MCP1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
Mef2a	<i>myocyte-specific enhancer factor 2A</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
<i>miR-145</i>	<i>microRNA-145</i>
<i>miR-143HG</i>	<i>microRNA-143 host gene</i>
ml	Milliliter
MLC	Myosin-leichte-Kette
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
mM	Millimol
mm	Millimeter
mm Hg	Millimeter-Quecksilbersäule (Torr)
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSK	<i>mitogen- and stress-activated protein kinases 1 and 2</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-1	Neurofibromin 1
Nfatc2	<i>nuclear factor of activated T-cells 2</i>
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
Nrarp	<i>NOTCH regulated ankyrin repeat protein</i>
OD	optische Dichte
OE	<i>overexpression</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGF-BB	<i>platelet-derived growth factor-BB</i>
PDGF-R	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinosid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLC-β	Phospholipase C beta
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP1C	Proteinphosphatase Typ 1

PP2A	Proteinphosphatase Typ 2
PPAR $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PTx	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RAF-1	<i>proto-oncogene c-RAF</i>
rev.	<i>reverse</i>
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RGS	<i>regulators of G-protein signaling</i>
RhoA	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
Rhod-4	Rhodamin-4
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPL	ribosomales Protein L32
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RSK	p90 ribosomal S6 kinase
s	Sekunden
s.	siehe
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM22 $\alpha$	<i>smooth muscle 22-<math>\alpha</math></i>
SMC	<i>smooth muscle cell</i>
SM-MHC	<i>smooth muscle-myosin heavy chain</i>
SMWT1	<i>smooth muscle wildtype 1</i>
SMWT2	<i>smooth muscle wildtype 2</i>
Src	<i>Src proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
t	Zeit
TAT	<i>transactivator of transcription</i>
TBS-T	<i>Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween®20</i>
TCF	<i>ternary complex factor</i>
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
TNC	<i>Tenascin C</i>
Tubb2a	<i>Tubulin beta 2a</i>
U	<i>Units</i>
V	Volumen
v/v	Volumenanteil
VCP	<i>valosin containing protein</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
WNK1	<i>WNK lysine deficient proteine kinase 1</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 2 Zusammenfassung

**Rationale:** Bluthochdruck-assoziierte Herz- und Kreislauferkrankungen bilden weltweit die häufigste Todesursache. Besonders vaskulären, pathophysiologischen Zuständen geht oft ein arterieller Gefäßwandumbau voraus. Maßgeblich an diesem Umbau beteiligt sind glatte Gefäßmuskelzellen (GMZ). Diese erhalten im arteriellen System durch Kontraktion den myogenen Tonus aufrecht. Verändert sich das arterielle System pathologisch, beginnen GMZ zu proliferieren, zu migrieren und Matrixbestandteile freizusetzen. Die Fähigkeit dieser Zellen, ihre Funktion an die umgebende Situation anzupassen, wird Phänotypwechsel genannt. Sobald eine Zelle beginnt sich zu teilen oder zu migrieren, hat sie den synthetischen Phänotyp angenommen. Die Expression von Genprodukten des kontraktilen Apparates (z.B. *smooth muscle-myosin heavy chain* (SM-MHC) und Calponin) markiert dagegen ihren kontraktilen Phänotyp. Diese biologische Plastizität wird durch aktivierte G-Protein-Rezeptoren mitbestimmt, die gekoppelt sind an unterschiedliche G $\alpha$ -Untereinheiten wie G $\alpha_s$ , G $\alpha_{12/13}$ , G $\alpha_{q/11}$  und G $\alpha_{i/o}$ . Die beschleunigte Terminierung aktiver G $\alpha$ -Untereinheiten erfolgt durch *regulators of g-protein signaling* (RGS) Proteine. RGS5 kann in GMZ in der Funktion als *GTPase-activating protein* (GAP) die Terminierung der Aktivität der Untereinheiten G $\alpha_{q/11}$  und G $\alpha_{i/o}$  beschleunigen. Im arteriellen System kommt RGS5 eine besondere Bedeutung zu. Über die Involvierung von RGS5 in unterschiedliche pathologische Zusammenhänge wie Arteriogenese, Bluthochdruck und Neointimabildung wurde bereits berichtet. Die grundlegende Wirkung von RGS5 auf den Phänotypwechsel von GMZ, unabhängig von Umbauprozessen, wurde allerdings noch nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst der grundlegende Einfluss von RGS5 auf den Phänotyp kultivierter, synthetisch aktiver GMZ untersucht werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob der G $\alpha_{q/11}$ - und/oder G $\alpha_{i/o}$ -abhängige Signalweg die beobachteten Veränderungen bedingen könnte. In einem weiteren Ansatz sollten kultivierte GMZ biomechanisch gedehnt werden, um zu untersuchen, ob RGS5 einen Einfluss auf die Dehnungsantwort dieser Zellen hat. Zudem sollte eine transgene Maus generiert werden, die RGS5 ausschließlich in GMZ überexprimiert, um in einem späteren Ansatz die Relevanz der *in vitro*-Ergebnisse durch *in vivo*-Versuche zu überprüfen.

**Methoden und Ergebnisse: (I)** Anhand einer Transkriptomanalyse konnte unter Adenovirus-Vektor-induzierter RGS5-Überexpression die reduzierte Expression zellzyklusabhängiger Gene erfasst werden. Eine reduzierte Anzahl sich teilender Zellkerne nach RGS5-Überexpression bestätigte eine Einschränkung der Zellteilung. Neben der Proliferation ist auch die Migration ein Merkmal des Phänotypwechsels. Im Rahmen von Migrationsuntersuchungen konnte dazu eine Hemmung der Migration der GMZ nach RGS5-Überexpression beobachtet werden. Ferner konnte nach RGS5-Überexpression ein Calponin-Anstieg in kultivierten GMZ dokumentiert werden. Um die Spezifität RGS5-vermittelter Effekte auf den Phänotyp kultivierter GMZ beurteilen zu können, wurde RGS16, das

im Vergleich zu RGS5 eine schwächere Inhibition der  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivität bewirkt, ebenfalls überexprimiert und bezüglich seiner Wirkung untersucht. Eine Überexpression von RGS16 zeigte dabei lediglich in Proliferationsuntersuchungen einen signifikanten RGS5-ähnlichen Effekt. Die Erfassung von möglichen, ebenfalls an den beobachteten Effekten beteiligten Signalmolekülen erfolgte zunächst mit Hilfe eines Proteinkinasenaktivitäts-Arrays. Dabei zeigte sich nach RGS5-Überexpression eine reduzierte Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2. Im Rahmen dieser Arbeit ahmte ausschließlich die Inhibition der Aktivität der  $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit und damit die Aktivierung der Adenylatzyklase durch deren Stimulator Forskolin die Effekte von RGS5 auf die Phosphorylierung von ERK1/2, die Proliferation und Migration nach.

**(II und III)** Nach RGS5-Überexpression konnte in GMZ ein Anstieg der RhoA-Aktivität beobachtet werden. RhoA ist wiederum bei der Dehnungsantwort und damit u.a. an dem Phänotypwechsel dieser Zellen beteiligt. In gedehnten GMZ wurde gleichzeitig ein Anstieg der RGS5-Menge beobachtet. Um nun zu überprüfen, ob das erhöhte RGS5-Vorkommen die Dehnungsantwort dieser Zellen beeinflusst, wurde eine weitere Transkriptomanalyse durchgeführt. Nach biomechanischer Dehnung der GMZ, die RGS5 überexprimieren, konnte dabei ein Anstieg in der Expression der Gene *mki67* und *cdk1*, deren Genprodukte die Zellteilung anzeigen, festgestellt werden. Gleichzeitig stieg die Genexpression typischer dehnungsassoziierter Marker wie Interleukin-8 und Interleukin-33 an.

**(IV)** Die Generierung einer transgenen Maus sollte es ermöglichen eine RGS5-Überexpression ausschließlich in GMZ einzuleiten. Damit sollte die Relevanz der *in vitro*-Effekte von RGS5 *in vivo* untersucht werden. Initiale Versuche zeigten eine erfolgreiche Induktion der mRNA-Expression von RGS5 in Gefäßen und GMZ nach Tamoxifen-Induktion der Cre-Rekombinase-Expression bzw. Cre Rekombinase-Behandlung.

**Zusammenfassung:** Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im *in vitro*-Kontext **(I)** eine Redifferenzierung des *in vitro* bereits synthetisch aktiven Phänotyps von GMZ zum kontraktilen Phänotyp durch RGS5-Überexpression. Zusätzlich weisen die Daten für RGS5 **(II)** auf eine mögliche Rolle als Dehnungssensibilisator in GMZ hin. Des Weiteren lassen diese Befunde **(III)** eine kontext-gebundene Wirkweise für RGS5 in GMZ vermuten. Mit der Generierung der transgenen Maus **(IV)**, die RGS5 glattmuskelzellspezifisch und induzierbar verstärkt exprimiert, konnte der Grundstein gelegt werden für *in vivo*-Untersuchungen der RGS5-Funktion im pathophysiologischen Kontext.

### 3 Summary

**Rationale:** Blood pressure-associated cardiovascular diseases still remain one of the most frequent causes of mortality and morbidity worldwide. These pathological conditions are accompanied by arterial remodelling processes of the vessel wall with a predominant vascular smooth muscle cell (SMC) contribution. While vascular SMCs maintain the myogenic tone by contraction in a healthy environment, pathophysiological changes in the arterial system lead to reduced contractility of SMCs and yet increased proliferation, migration as well as production and secretion of matrix proteins. The ability of vascular SMCs to adapt their function to environmental changes is referred to as the “phenotypic switch”. i.e. a shift from the quiescent contractile to the juvenile so called “synthetic phenotype” as soon as the cells start to proliferate and exhibit an enhanced migratory capacity. Vascular SMC contraction and the expression of gene products of the contractile apparatus such as *smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC) and calponin, however, constitute what is known as the “contractile phenotype”.

This biological plasticity is highly regulated by G-protein-receptor (GPCR)-depending signaling pathways, coupled to G $\alpha$ -subunits like G $\alpha_s$ , G $\alpha_{12/13}$ , G $\alpha_{q/11}$  und G $\alpha_{i/o}$ . Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins accelerate inactivation of these subunits, therefore terminating intracellular signaling based on GPCR-activation. In a healthy cardiovascular system, RGS5 terminates the activity of the subunits G $\alpha_{q/11}$  and G $\alpha_{i/o}$  by acting as a GTPase-activating protein (GAP). In the pathological context of arterial remodelling processes, RGS5 has been implicated in a number of pathological conditions including hypertension, arteriogenesis and neointima formation. Only little is known about its basic function in vascular SMCs besides pathophysiologic remodelling processes. Likewise, the mechanisms inducing the phenotype change of vascular SMCs still remain unclear.

Therefore, the aim of this work was to analyse the fundamental effects of RGS5 on SMC plasticity. The detailed scope of this work consisted of investigating basic effects of RGS5 on the phenotype of cultured, synthetic arterial SMCs. In addition, it was of interest to investigate whether active G $\alpha_{q/11}$ - and/or G $\alpha_{i/o}$ -based signaling drive the observed effects. Furthermore, cultured arterial SMCs were cyclically stretched to examine the effect of RGS5-overexpression on their response of SMCs to deformation as it occurs, e.g. in arterial hypertension. Additionally, a SMC specific, RGS5 overexpressing transgenic mouse model was generated which may be utilized in the near future to further validate the relevance of the *in vitro* findings in an *in vivo* setup.

**Methods and Results: (I)** Microarray-based transcriptome analysis revealed a reduction in gene expression of cell cycle markers in cultured, synthetic arterial smooth muscle cells upon RGS5 overexpression. A reduction in the number of Ki-67-positive arterial SMCs following RGS5overexpression corroborated the microarray data suggesting reduced proliferation. Given that

enhanced migration of vascular SMCs is indicative of the synthetic phenotype, spheroid-based migration studies were utilized to investigate whether RGS5 overexpression reduces the migratory properties of these cells. Subsequently, cells showed an increase in calponin abundance. Moreover, to define the unique functions of RGS5, a comparative analysis was carried out for another RGS protein, RGS16. RGS16 has a weaker effect on the activity of the  $G\alpha_{i/o}$  subunit as compared to RGS5 and only the inhibitory effect on vascular SMC proliferation upon RGS16 overexpression was comparable to that observed upon overexpression of RGS5. For further investigation on the underlying mechanism of RGS5 signaling in SMCs the phosphorylation hence activation pattern of a broad range of protein kinases was analysed by using a commercial profiler array. The results revealed reduced phosphorylation of the MAP kinase ERK1/2 upon RGS5 overexpression. Increased activity of adenylate cyclase using forskolin also mimicked the effects of RGS5 on proliferation and migration of the vascular SMCs and repressed ERK1/2 phosphorylation.

**(II and III)** SMCs revealed an increase in the amount of GTP-bound RhoA immediately after RGS5 overexpression. Active RhoA is a stretch sensitizer and a key modulator of vascular SMC plasticity during arterial remodelling processes. At the same time, stretched SMCs revealed increased levels of RGS5. To investigate whether RGS5 is involved in the stretch response of the vascular SMCs, a microarray-based transcriptome analyses was carried out with stretched and static control SMCs. This revealed an increase in gene expression of cell cycle markers in the vascular SMCs overexpressing RGS5. At the same time, expression of genes coding for stretch-associated marker proteins like interleukin-8 and interleukin-33 was upregulated.

**(IV)** The generation of a transgenic mouse further enabled additional and inducible expression of RGS5 exclusively in vascular SMCs. Initial experiments validated an increase in RGS5 mRNA expression in blood vessels of the transgenic animals after tamoxifen induction of Cre recombinase expression and in vascular SMCs isolated from these animals when subjected to exogenous Cre recombinase treatment.

**Conclusion:** The results of this work indicate **(I)** a phenotype shift of “synthetic” vascular SMCs towards the quiescent, “contractile” phenotype upon RGS5 overexpression *in vitro*. At the same time, **(II)** an increase in stretch-associated gene expression and reversed gene expression of cell cycle markers upon stretch exposure point towards a role for RGS5 as a stretch sensitizer. Furthermore, these changes upon stretch induction reveal **(III)** a context-dependent function for RGS5 in vascular SMCs. On the other hand, these findings highlight the need to investigate the functional role of RGS5 *in vivo*. **(IV)** The specific transgenic mouse model of a conditional and cell-specific overexpression of RGS5 in vascular SMCs generated herein will serve as a corner stone for future investigations into the functional role of RGS5 in pathophysiological settings.

## 4 Einleitung

### 4.1 Aufbau und Funktion des Herz-Kreislaufsystems

Das Kreislaufsystem gehört zu den wichtigsten Transportsystemen im menschlichen Körper und versorgt mithilfe des Blutes als Trägermedium Körperzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Gleichzeitig transportiert das Blut Stoffwechselendprodukte wie  $\text{CO}_2$  oder andere Katabolite wieder ab, die über die Lunge bzw. die Nieren aus dem Körper eliminiert werden. Das Kreislaufsystem sorgt für einen zügigen Zu- und Abtransport trotz langer Wege und gewährt gleichzeitig die interzelluläre Signalweiterleitung.

Innerhalb kurzer Distanzen im einfachen  $\mu\text{m}$ -Bereich verläuft der Stofftransport entlang eines Konzentrationsgradienten durch erleichterte Diffusion. Dies ist beim Gasaustausch zwischen dem Alveolarraum und den Lungenkapillaren oder beim Stoffwechsel zwischen Zellen und Kapillaren der Fall. Über längere Distanzen greift statt der Diffusion die Konvektion als Transportmechanismus. Während die Diffusion einen Stoffgradienten voraussetzt und stets von einer höheren Stoffkonzentration zur niedrigeren erfolgt, benötigt die Konvektion die Stoff- bzw. Teilchenverteilung durch externe Energiezufuhr und ein Trägermedium. Für gasförmigen Sauerstoff ist das Trägermedium die Atemluft, dessen konvektive Transportfunktion durch das Ein- und Ausatmen im Alveolarraum erfolgt. Ein weiteres Trägermedium ist wie bereits beschrieben das Blut, dessen konvektive Transportfunktion durch den Blutfluss gegeben ist.

Ein komplexes System hält im Menschen ein ungefähres Blutvolumen von 5 Litern durch Innendruckgradienten ständig in Bewegung. Diese Bewegung wird durch eine rhythmische Abfolge der Herzmuskelkontraktion (Systole) und Herzmuskelrelaxation (Diastole) gewährleistet. Dabei füllen sich während der Diastole die Herzkammern, die sogenannten Ventrikel, mit Blut. In der Systole werden ca.  $\frac{2}{3}$  dieses Blutvolumens aus den Ventrikeln in die jeweilige Ausflussbahn ausgeworfen. Im ruhenden Körperzustand entspricht das einem Schlagvolumen von 80 ml. Da die Eigenelastizität der Aorta etwa 1 mm Hg pro ml Blut entspricht und durch den so genannten Windkesselleffekt zunächst die Hälfte dieses Schlagvolumens zurückbleibt, steigt der systolische Blutdruck von 80 mm Hg um 40 mm Hg auf 120 mm Hg an. Das Produkt aus dem Schlagvolumen und der Herzfrequenz ergibt das in den Körper- (linker Ventrikel) bzw. Lungenkreislauf (rechter Ventrikel) ausgeworfene Herzzeitvolumen von ca. 5 Liter pro Minute. Der arterielle Mitteldruck im Gefäßsystem beträgt 100 mm Hg und entspricht herznah dem diastolischen Blutdruck plus die halbe Blutdruckamplitude (Differenz zwischen diastolischem und systolischem Blutdruck). Während der systolische Blutdruck maßgeblich vom zirkulierenden Blutvolumen und der Auswurfleistung des Herzens abhängt, wird der diastolische Blutdruck primär durch den peripheren Gefäßwiderstand in den so genannten Widerstandsgefäßen

(Endarterien und Arteriolen) bestimmt. Die für die Zirkulation des Blutes im Körperkreislauf treibende Kraft ist der mittlere arterielle Blutdruck vermindert um den zentralvenösen Druck von ca. 5 mm Hg und beträgt somit normalerweise etwa 95 mm Hg. Im Ruhezustand schlägt das Herz eines erwachsenen Menschen 60 bis 80-mal pro Minute<sup>1</sup>.

#### 4.1.1 Hochdruck- und Niederdrucksystem

Das Kreislaufsystem wird in den Lungen- und Körperkreislauf unterteilt. Dabei spielt die Serienschaltung, durch die das rechte Herz dem linken Herz vorgeschaltet ist, eine wesentliche Rolle. Die rechte Herzhälfte nimmt das sauerstoffarme Blut aus den großen Hohlvenen im Thorax auf. Danach wird das Blut im Lungenkreislauf mit Sauerstoff angereichert und gelangt von dort in die linke Herzhälfte. Aus der linken Herzhälfte wird es dann in den Körperkreislauf gepresst. Das Hochdrucksystem entspricht dabei dem arteriellen Anteil des Körperkreislaufs plus dem linken Ventrikel während der Systole, während Herzvorhöfe, rechter Ventrikel, Lungenkreislauf und das Venensystem dem Niederdrucksystem entspricht. Diese funktionelle Aufteilung des Kreislaufsystems orientiert sich auch an den intravasalen Druckgradienten in den Blutgefäßen<sup>1</sup>. Demnach ist der intravasale Druckabfall in großen Leitungsarterien im Vergleich zu den Widerstandsgefäßen, Endarterien und Arteriolen praktisch nicht vorhanden. Nach der Drosselung des Blutdrucks auf wesentlich niedrigere Werte (ca. ein Drittel) durch die Widerstandsgefäße fällt dieser über die Kapillaren im Körperkreislauf (Ausnahme Lungen und Nieren) weiter ab, sodass das Venensystem eine wesentlich niedrigere treibende Druckdifferenz erfährt; deshalb spricht man hier auch von einer Einspeicherung bzw. Entspeicherung dieser Kapazitätsgefäße durch Veränderung des hydrostatischen Drucks.

Im Hochdrucksystem herrscht dagegen der vom Herzen erzeugte hydrodynamische Druck (Schlagvolumen) plus der (lokale) hydrostatische Druck (je nach Körperlage) vor, dieser wird im Wesentlichen durch den regulierbaren Widerstand der Endarterien und Arteriolen beeinflusst. Kontrahieren die Widerstandsgefäße, steigt der periphere Widerstand und damit der Blutdruck, während die Durchblutung sinkt, dilatieren sie, fällt der Blutdruck entsprechend ab und die Durchblutung nimmt zu<sup>1</sup>.

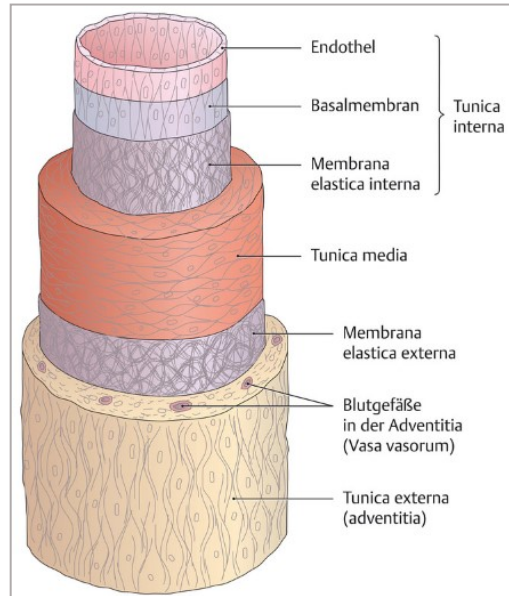
Sobald das Blut die Kapillaren erreicht hat, findet ein Übergang zum Niederdrucksystem statt. Es entspricht dem venösen System und umfasst die Venolen, Venen, die *Vena Cava inferior* und die *Vena cava superior*, den rechten und linken Vorhof sowie die Lungenstrombahn. Hierin herrscht ein niedriger Innendruck. Dieser Abschnitt des Gefäßsystems beinhaltet das größte Blutvolumen (zusammengenommen etwa 85%), weshalb es auch das Volumenreservoir genannt wird. Die Funktion des Niederdrucksystems liegt darin, bei einer hydrostatisch bedingten Umverteilung des Blutvolumens unter die hydrostatische Indifferenzebene, Blut vor allem aus dem Venensystem der Lunge zur



Verfügung zu stellen. So kann bei einem Lagewechsel (Aufstehen) u.a. eine orthostatische Synkope vermieden werden<sup>2</sup>.

#### 4.1.2 Aufbau und Funktion von Arterien

Arterien, die Gefäße des Hochdrucksystems, sind einem hohen Innendruck ausgesetzt. Sie sind im Vergleich zu den Gefäßen des Niederdrucksystems, den Venen, dickwandig. Die Dicke und Zusammensetzung der Gefäßwand variiert hierbei auch innerhalb der Arterien je nach Entfernung zum Herzen. Die Gefäßwand setzt sich zusammen aus der *Tunica interna* bzw. *intima*, der *Tunica media* und der *Tunica externa* bzw. *adventitia* (Abbildung 1). Die *Tunica interna* besteht aus einer einzigen Schicht Endothelzellen, ausgerichtet in Blutflussrichtung. Dadurch bildet sie gleichzeitig eine anpassungsfähige Grenze, die Substanzen selektiv durchlassen und um- und abbauen kann. Der Übergang von der *Tunica interna* zur *Tunica media* führt über die Kollagen- und Laminin-haltige Basallamina und Kollagen- und Elastin-haltige *Membrana elastica interna* bzw. *Lamina elastica interna*. Die *Tunica media* besteht aus mehreren Schichten von GMZ, die quer zur Blutflussrichtung ausgerichtet sind; sie bilden insofern eine Ringmuskulatur. Zusätzlich wird sie zur *Tunica externa* abgegrenzt durch die Fibroblasten-haltige *Membrana elastica externa* bzw. *Lamina elastica*. Die *Tunica externa* bildet schließlich die äußere Schicht der Gefäße und bettet diese in das umliegende Gewebe ein. Sie besteht aus Fibroblasten und diffusem Bindegewebe. In dickwandigeren Gefäßen liegt hier auch an die *Tunica media* angrenzend das mit kleinsten Arterien und Venen gefäßnährende *Vasa vasorum*, das gleichzeitig auch Gefäßwandschichten innerviert<sup>3,4</sup>.



**Abbildung 1 Schematischer Aufbau einer Arterie des muskulären Typs.** Die unterschiedlichen Schichten der Gefäßwand bilden einen komplexen Gefäßkörper (nach Schülte)<sup>199</sup>.

Gefäßabschnitte können je nach Funktion bezüglich ihres Elastin- und Gefäßmuskelzellanteils variieren. So haben herznahe Leitungsarterien mit Windkessелеigenschaft, deren elastische Fasern die hohe Druckpulsenergie des Blutstroms aufnehmen müssen, einen hohen Elastinanteil in der *Tunica media*. Das sind neben der Aorta, die *Arteria carotis communis*, die *Arteria pulmonalis* (Pulmonalarterie) und die Hauptabgänge der genannten Gefäßabschnitte. Sie stellen somit die Arterien des elastischen Typs dar. Die *Tunica media* in Widerstandsgefäßen (Endarterien und Arteriolen) in der Körperperipherie wiederum besteht überwiegend aus GMZ<sup>1</sup>. Arterien des muskulären Typs verbinden die Widerstandsgefäße mit den elastischen Arterien. Arteriolen haben zwar nur wenige Lagen von GMZ, dennoch ist diese Schicht relativ zur Dicke der Arteriolenwand stark

ausgeprägt; sie verzweigen sich schließlich zu den Kapillaren. Kapillaren bestehen nur noch aus einer Endothelzellschicht, der Basallamina und Perizyten, die um die Basallamina angeordnet sind<sup>5</sup>. Sie dienen dem Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe, wobei dieser sich auch noch auf die postkapillären Venolen erstreckt<sup>1,6</sup>. Alle Gefäße des Kreislaufsystems können prinzipiell durch Kontraktion und Dilatation den Innendurchmesser und damit die Lumenweite und die Durchblutung bestimmen, besonders stark ausgeprägt und physiologisch relevant ist diese Eigenschaft aber nur in den Widerstandsgefäßen. Kontraktion und Relaxation der Widerstandsgefäße werden durch lokale Faktoren, wie Stoffwechselprodukte, durch endotheliale Botenstoffe wie Eikosanoide und Stickstoffmonoxid (NO) über das vegetative Nervensystem beeinflusst.

#### 4.1.3 Kontraktion und Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen

Die Gefäßmuskelzellschicht spielt in Arterien eine entscheidende, funktionsgebende Rolle, indem sie die Gefäßweite durch ihre ringförmige Anordnung und die Entwicklung und Konstanthaltung einer Wandspannung aktiv reguliert. Damit kontrolliert sie den Gefäßtonus. Die Gefäßmuskulatur selbst hat im Ruhezustand einen sogenannten myogenen Basistonus<sup>1</sup>. Auf intrazellulärer Ebene wird der Tonus durch humorale Stimuli wie Noradrenalin, Angiotensin II (Ang II), Vasopressin und Endothelin-1 (ET-1) und vor allem NO, Histamin, Bradykinin oder Prostazyklin bestimmt. Dabei binden diese Substanzen mit Ausnahme des NO entweder an Rezeptoren von GMZ oder an Rezeptoren der angrenzenden Endothelzellen und lösen damit eine Kontraktion bzw. Relaxation aus<sup>7</sup>.

**Kontraktion:** Es gibt zwei unterschiedliche Kontraktionsformen. Die schnelle bzw. phasische Kontraktion ist primär  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, während die langsame bzw. tonische Kontraktion in erster Linie die Aktivität der Phosphokinase C (PKC) voraussetzt.

Der phasischen Kontraktion der Gefäßmuskelzellen geht eine Änderung in der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die Aktivierung der Myosin-Leichte-Ketten Kinase (MLCK) voraus. Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann primär durch die Freisetzung von gespeicherten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) herbeigeführt werden. Die freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden an Calmodulin, das wiederum durch die MLCK gebunden wird und ein Calcium-Calmodulin-MLCK-Holoenzym bildet<sup>2</sup>. Es kommt zur Phosphorylierung der MLCK unter Nutzung von Adenosintriphosphat (ATP). Die Phosphorylierung erfolgt an der leichten Kette des Myosins (MLC), an deren Enden die schweren Myosinköpfe als Myosin-ATPasen lokalisiert sind. Die Myosin-ATPasen hydrolysieren das ATP nach Ablösen von Aktin durch ATP-Anlagerung an den Myosinköpfen und setzen die Energie aus der Hydrolyse zur erneuten Interaktion frei. Sobald der ATP-gebundene Myosinkopf an Aktin bindet, kommt es zu einer Querbrückenbindung zwischen Myosin und Aktin. Das Myosin hydrolysiert dabei das ATP zu  $\text{ADP} + \text{P}_i$  (anorganischer Phosphatrest). Der anorganische Phosphatrest löst sich vom Myosin-ATP-Komplex, das die Energie freisetzt, die zur

Konformationsänderung des Myosins, dem sogenannten *power stroke*, notwendig ist. Die Konformationsänderung führt schließlich zur Kontraktion. Sobald sich das ADP vom Myosin gelöst hat, nimmt der Myosinkopf seine Ursprungskonformation wieder ein. Dieser Ablauf verläuft zyklisch<sup>1,2</sup>.

Der tonischen Kontraktion geht ebenfalls, wie bei der phasischen Kontraktion, die Spaltung des Phospholipids der Zellmembran Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) voraus. Während bei der phasischen Kontraktion die Bindung des IP<sub>3</sub> an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor des ER und der damit verbundene Ca<sup>2+</sup>-Anstieg innerhalb der Zelle von größerer Bedeutung ist, liegt der Schwerpunkt der tonischen Kontraktion auf der Aktivierung der PKC durch DAG und der Hemmung der Aktivität der MLC Phosphatase (MLCP). MLCP ist ein MLCK-Antagonist, der durch das *PKC-potentiated inhibitor 17-kDa* Protein CPI-17, das wiederum durch PKC phosphoryliert wird, gehemmt wird. Gleichzeitig aktiviert die aktive Rho-GTPase, RhoA, die Rho Kinase (ROCK). ROCK wiederum phosphoryliert die Untereinheit der MLCP und wirkt dadurch ebenfalls hemmend auf die Aktivität der MLCP. Somit kommt es nicht nur durch die Aktivierung der MLCK zu einer Kontraktion, sondern durch die Hemmung der MLCP-Aktivität auch zum Erhalt der Kontraktion und zum Erhalt der Tonuszunahme<sup>1,2</sup>. Sowohl die phasische als auch die tonische Kontraktion basieren auf sogenannten Ca<sup>2+</sup>-sensitivierenden Signalwegen<sup>2</sup>.

**Relaxation:** Die Phosphorylierung der MLC ist reversibel und eine Dephosphorylierung der MLC führt wiederum zur Relaxation (s. 4.3.1). Die Relaxation der GMZ kann durch zyklische Nukleotide wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) erfolgen. Dem geht entweder eine G-Protein vermittelte Aktivierung des Enzyms Adenylatzyklase oder die Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch Endothelzellen voraus. So kann die Stimulation des G-Proteins Gα<sub>s</sub> durch die Anbindung von Adenosin oder Prostazyklin an den entsprechenden Rezeptor die cAMP-Konzentration über die verstärkte Adenylatzyklase erhöhen. Die Stimulation von Gα<sub>i/o</sub> durch die Anbindung von Noradrenalin oder Adrenalin an den entsprechenden Rezeptor hemmt indes die Aktivität der Adenylatzyklase. Die Aktivierung von cAMP oder cGMP führt zur Aktivierung ihrer Effektormoleküle Proteinkinase A bzw. Proteinkinase G. Beide Effektorpaare, cAMP/PKA und cGMP/PKG führen zur Steigerung der Aktivität von MLCP. MLCP entfernt den anorganischen Phosphatrest von der MLC des Myosins, sodass sich der Myosinrest vom Aktin löst und es zur Relaxation kommt<sup>8</sup>. Es kommt zum Anstieg von dephosphoryliertem Myosin. Gleichzeitig kann durch den Anstieg von cAMP bzw. cGMP die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der Zelle gesenkt werden. Hierbei wird die Aktivität der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des endoplasmatischen Retikulums durch die Phosphorylierung von Phospholamban durch PKA gesteigert, Ca<sup>2+</sup> wird dann durch Ca<sup>2+</sup>-ATPasen verstärkt in das ER der glatten Muskelzelle aufgenommen<sup>2</sup>.

Die Relaxation wird also zum einen bestimmt durch eine sogenannte Ca<sup>2+</sup>-Desensitivierung und zum anderen durch eine Senkung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Zytoplasma.

## 4.2 Pathophysiologische Veränderung von Blutgefäßen

Arterielle Remodellierungsprozesse sind Anpassungsreaktionen von Gefäßwänden des arteriellen Systems auf mechanische und hämodynamische Reize. Unter diese Anpassungsreaktionen fallen strukturelle und funktionale Veränderungen in der Gefäßwand. Dabei können diese Remodellierungsprozesse abhängig von Gefäßtyp und -lokalisierung unterschieden werden. Hierbei kann es zu einem nach innen oder nach außen gerichteten Umbau kommen. Gleichzeitig stellt sich entweder eine Verdickung der Gefäßwand (hypertrophe Remodellierung) oder eine Verdünnung der Gefäßwand (hypotrophe Remodellierung) ein. Bleibt die Gefäßwanddicke konstant, so liegt eine eutrophe Remodellierung vor. In großen, elastischen Arterien kommt es im Rahmen von Remodellierungsprozessen zu einer Zunahme des Gefäßdurchmessers und einer verdickten Intima- und Mediaschicht der Gefäßwand. Es findet also eine nach außen gerichtete hypertrophe Remodellierung statt. Im Gegensatz dazu liegt in kleinen, peripheren Widerstandsgefäßen des muskulären Typs eine nach innen gerichtete, meistens eutrophe Remodellierung ohne Dickenzunahme der Gefäßwand vor<sup>9,10</sup>. Allerdings verringert sich hierbei das Gefäßlumen<sup>11</sup>.

Die Verdickung der Gefäßwand erfolgt, je nach Gefäßtyp, durch eine Hypertrophie bzw. Hyperplasie der GMZ der Media und durch den Umbau der extrazellulären Matrix. Während die elastische Schicht der Gefäßwand im gesunden Gewebe die passive Aufdehnung des Gefäßes ermöglicht und den systolischen Druckpuls dämpft, verteilt die glatte Gefäßmuskelschicht durch Kontraktion und Relaxation aktiv die Spannung in der Gefäßwand um. Durch die Gefäßwandumstrukturierung und der zunehmend durch den Kollageneinbau fibrotischen *Lamina elastica* wird dieser abgestimmte Ablauf gestört. Bei erhöhtem Blutdruck kommt es dann gemäß der LaPlace-Beziehung (s. 4.2.1) zu einer Erhöhung der Wandspannung. Die Verdickung der Gefäßwand wirkt der damit einhergehenden Erhöhung der transmuralen Druckdifferenz entgegen.

Allerdings kommt hinzu, dass in adulten Gefäßen dabei kein Elastin mehr gebildet wird, sondern das nicht-dehnbare Kollagen I. Es resultiert eine Versteifung der Gefäßwand<sup>9</sup>. So haben pathophysiologische Fehlentwicklungen in kleinen und großen, elastischen Arterien häufig eine hochdruckbedingte, arterielle Gefäßversteifung zur Folge<sup>12</sup>.

### 4.2.1 Hypertonie

Bei einem erhöhten Druck in den Blutgefäßen und dem daraus resultierenden hohen Druck im Körperkreislauf wird von einer systemischen oder auch arteriellen Hypertonie gesprochen. Diese Form der Hypertonie erhöht das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den Industrienationen<sup>1</sup>. Zur Bestimmung eines erhöhten Bluthochdrucks werden der systolische und diastolische Blutdruck gemeinsam betrachtet. Von einem behandlungsbedürftigen Bluthochdruck wird ab einem systolischen

Wert von 140 mm Hg und ab einem diastolischen Wert von 90 mm Hg gesprochen. Dabei wird, basierend auf der Entstehungsursache, zwischen primärem (essentiell) und sekundärem Bluthochdruck unterschieden. Zu primärem Bluthochdruck führen neben der altersbedingten Gefäßversteifung, genetische Prädispositionen, Faktoren wie Adipositas, salzlastige Ernährung und Bewegungsmangel. Im Gegensatz dazu liegt dem selteneren, sekundären Bluthochdruck oft eine vorausgehende Erkrankung wie z.B. eine Nierenarterienstenose, die den Bluthochdruck verursacht, zugrunde. Zu diesen Erkrankungen zählen neben der Aortenisthmusstenose, vaskuläre und parenchymale Erkrankungen der Niere sowie endokrine Dysfunktionen, wie sie beim Cushing Syndrom vorliegen<sup>1</sup>.

Arterielle Hypertonie wird primär bestimmt durch eine Erhöhung des peripheren Widerstands und seltener durch ein vergrößertes Herzzeitvolumen<sup>13</sup>. Initial versuchen die Widerstandsgefäße durch eine vermehrte Vasokonstriktion die Hypertonie-bedingte Erhöhung der Wandspannung zu kompensieren. Erstreckt sich dieser Zustand allerdings über einen längeren Zeitraum, sodass die glatte Gefäßmuskelschicht langanhaltend kontrahieren muss, treten alternative Anpassungsreaktionen der Gefäßmuskelschicht ein. Durch die Hypertonie-induzierte Proliferation bzw. Hypertrophie der GMZ kommt es zu einer Verdickung der *Tunica media* und einem Umbau der extrazellulären Matrix mit der Folge, dass sich der Gefäßdurchmesser der Widerstandsgefäße dauerhaft verkleinert. Es kommt zu einem irreversiblen Anstieg des peripheren Widerstands und somit zur Fixierung des Blutdrucks auf einem deutlich erhöhten Niveau.

Mehrere Regelkreise im Körper beeinflussen die Entstehung von Bluthochdruck. Eine renale Minderdurchblutung, unabhängig davon, ob sie systemisch durch einen niedrigen Blutdruck bedingt ist, durch die Veränderung von Nierengefäßen oder lokalen Gefäßkontraktionen, führt zur Ausschüttung von Renin durch die Kapillaren der Glomeruli, dem juxtaglomerulären Apparat<sup>2</sup>. Die Reninfreisetzung erfolgt dabei entweder über eine  $\beta$ -adrenerge Innervation der juxtaglomerulären Zellen oder indirekt über die  $\alpha$ -adrenerg ausgelöste Kontraktion der zuführenden afferenten Arteriolen (*Vasa afferentia*). Die Aspartatprotease Renin spaltet vom lebereigenen nicht-inhibitorischen Serpin Angiotensinogen, das zehn Aminosäuren umfassende Angiotensin I ab. Das *Angiotensin-Converting Enzyme* ACE, das sowohl in Gefäßen an der Oberfläche von Endothelzellen als auch in der Lunge vorhanden ist, zirkuliert in gelöster Form auch im Blutplasma. Es spaltet das Angiotensin I weiter in das nur noch acht Aminosäuren umfassende Ang II<sup>1,3</sup>.

Zunächst bewirken diese lokalen Regelkreise mittelfristige Anpassungsreaktionen, die zu einem systemisch erhöhten Blutdruck führen können, und zwar einerseits durch die Wirkung von Angiotensin II auf den peripheren Widerstand und andererseits durch eine vermehrte Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Letzteres hat eine vermehrte Wasserretention in den Sammelrohren der

Nieren und damit eine Erhöhung des Blutvolumens zur Folge. Beides steigert den Blutdruck, sodass es langfristig zu einer Beeinträchtigung der Pumpfunktion des linken Ventrikels kommen kann.

Die vasokonstriktorische Wirkung von Ang II kommt genauso wie die Stimulation der Freisetzung von Aldosteron über dessen Bindung an den Typ 1 Angiotensin-Rezeptor (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) zustande<sup>14</sup>. Dadurch steigt der diastolische Blutdruck an<sup>15</sup>. Die Erhöhung des Blutvolumens durch Aldosteron, welches die Natriumretention in den Sammelrohren der Niere steigert, kann nur funktionieren, wenn gleichzeitig mehr Vasopressin aus der Neurohypophyse freigesetzt wird, welches für die durch den transepithelialen Natriumgradienten getriebene Wasserretention über den Einbau von Wasser-permeablen Aquaporin-2 Kanälen in die luminale Membran der Epithelzellen im Sammelrohr verantwortlich ist. Das atriale natriuretische Peptid (ANP) ist der Gegenspieler von Aldosteron und Vasopressin, indem es, durch die Hypervolämie im rechten Vorhof vermehrt freigesetzt, an den Renin-speichernden Granulazellen der *Vasa afferentia* dafür sorgt, dass Renin vermindert freigesetzt wird. Bei dieser Reaktion handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieses Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, welches nicht nur für die Kontrolle des peripheren Widerstands sondern auch des zirkulierenden Blutvolumens von entscheidender Bedeutung ist.

Der z.B. Angiotensin II-vermittelte Tonusanstieg in den Widerstandgefäßen wirkt sich insbesondere auf die Höhe des diastolischen Blutdrucks aus und kann in der Folge zu Umbauprozessen in diesen Gefäßen führen, welche den peripheren Gefäßwiderstand weiter erhöhen und dadurch die Organdurchblutung kompromittieren.

**Laplace-Beziehung nach Pierre-Simon Marquis de Laplace:** Hat sich der Bluthochdruck allerdings manifestiert, ist die Konsequenz eine Verdickung der *Tunica media* bei gleichzeitiger Verengung des Gefäßdurchmessers. Dieser Effekt wird nach Mulvany *et al.*<sup>16</sup> als *inward remodeling* bezeichnet. Die Physik hinter dieser Kompensation lässt sich mit dem Gesetz nach LaPlace:  $S_t = \frac{(\Delta P_{tm}) \cdot r}{h}$  näher erläutern. Die (zirkumferentielle) Spannung in der Gefäßwand ( $S_t$ ) bildet sich dabei aus dem Produkt der transmuralen Druckdifferenz ( $\Delta P_{tm}$ ) und dem Gefäßradius ( $r$ ) in Abhängigkeit von der Wanddicke ( $h$ ). Der transmurale Druck gibt dabei das Delta zwischen dem intra- und extravasalen Druck an<sup>17</sup>. Steigt diese transmurale Druckdifferenz, dann steigt gleichzeitig auch die Wandspannung. Um dies zu kompensieren und die Wandspannung dadurch zu reduzieren, bewirkt das *inward remodeling* eine Zunahme der Gefäßwanddicke. Die gleichzeitige Reduktion im Gefäßinnenradius und somit die Verengung des Gefäßes erhöht allerdings den Gefäßwiderstand und führt letztlich zu einem maladaptiven Gefäßwandumbau<sup>18,19</sup>. Dieser ist u.a. gekennzeichnet durch eine gleichzeitige Veränderung der Zusammensetzung und der Struktur der extrazellulären Matrix<sup>20</sup>.

#### 4.2.2 Neointimabildung

Die Neointimabildung ist die Veränderung und Erneuerung der Gefäßwand im Intimabereich durch die umfassende Erhöhung der Zellzahl und der extrazellulären Matrixkomponenten<sup>21</sup>. Newby und Zaltsman<sup>22</sup> nennen drei Auslöser der krankhaften Ausformung der Intima, nämlich Gefäßwandverletzung, Gefäßwandentzündung und Anstieg der Gefäßwandspannung. Jedem dieser Auslöser folgen unterschiedliche Reaktionskaskaden. Dabei folgt auf Verletzungen, bei denen lediglich das Endothel betroffen ist oder eine Verletzung der *Tunica media* durch Dehnung erfolgt, eine verstärkte Freisetzung von Kollagen aus GMZ. Im weiteren Verlauf soll die Bildung einer Neointima als Konsequenz einer Entzündungsreaktion nach Gefäßverletzung (Drucktrauma) z.B. als Folge eines interventionellen Eingriffs, wie der perkutanen transluminalen Angioplastie mithilfe eines Ballonkatheters, näher erläutert werden.

Während einer Ballonangioplastie wird ein auf einem Katheter montierter Ballon in das verengte Gefäß eingeführt und kurzzeitig auf 12-18 bar ausgedehnt. Diese Ausdehnung hat Schäden der Gefäßwand zur Folge. Durch die kurzzeitige Ausdehnung im Gefäßlumen kommt es zur direkten Druckausübung auf die Endothelschicht und die darunter liegende mediale Gefäßmuskelzellschichten. Es kommt zu einem Drucktrauma. Das unausweichliche Entfernen des Katheters aus dem Gefäß hat zudem Verletzungen des Endothels zur Folge. Als eine direkte Reaktion auf das Drucktrauma, gepaart mit der lädierten Endothelschicht, reagieren die umliegenden Zellen der Gefäßwand mit Apoptose. Das verschafft mehr Platz an der Gefäßwand. Es kommt zusätzlich zum Abbau der Matrix, die die GMZ umgibt. So können diese in die Neointima wandern, also migrieren. Allerdings ist die Induktion der Migration von GMZ der *Tunica media* durch die *Lamina elastica interna* multifaktoriell bestimmt. Die Rekrutierung von Leukozyten an die Läsionsstelle, u.a. bedingt durch die reduzierte NO- und Prostazyklinsekretion durch das verletzte Endothel, induziert die Migration von GMZ. Der *platelet-derived growth factor* (PDGF) verstärkt im Kontext der Neointimabildung sowohl die Migration, als auch die Proliferation von GMZ. Es löst Signalkaskaden und die darauf folgende Aktivierung von GMZ aus. Der Migration von GMZ durch die *Tunica media* an die verletzte Stelle der *Tunica intima* geht der Abbau der extrazellulären Matrix durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), wie MMP-9<sup>23</sup>, zu Teilen voraus.

In der Neointimaregion angelangt proliferieren die GMZ. Unterschiedliche Mitogene sind involviert in die Proliferation der GMZ. *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) ist ein Wachstumsfaktor, der unter Dehnungseinwirkung die Proliferation von GMZ antreibt. Sowohl GMZ als auch Endothelzellen produzieren bFGF nach einer Gefäßverletzung. Parallel dazu unterstützen ET-I und Ang II das Wachstum von GMZ. Ang II aktiviert dabei die mitogenen Proto-Onkogene c-Jun und JunB<sup>24-26</sup>. Neben den Mitogenen, die die Proliferation von GMZ induzieren, führt in diesem Zusammenhang der Verlust

von Wachstumsinhibitoren ebenfalls zur Proliferation<sup>24</sup>. Wachstumsinhibitoren sind dabei Heparinsulfat, *transforming growth factor-beta* (TGF $\beta$ ), *bone morphogenic proteins* (BMPs) oder Stickstoffmonoxid (NO). Die durch die Gefäßwandverletzung einhergehende Verletzung des Endothels hat eine verminderte Freisetzung von Prostazyklin und NO zur Folge. NO ist wiederum ein Inhibitor der Proliferation von GMZ. Diese Faktoren regen den Phänotypwechsel von GMZ an und führen zu deren Vermehrung. Es kommt zu einer echten Hyperplasie und nicht zu einer Hypertrophie wie es unter Bluthochdruck der Fall ist. Gleichzeitig kommt es zur Resynthese von Matrixproteinen, zumeist Kollagen, durch die GMZ in der Neointima. Sowohl die Proliferation als auch die Matrixproteinsynthese führen zur Verdickung der Gefäßwand durch einen Muskelmassenzuwachs. Zusätzlich kommt es zu einer Versteifung bzw. Stabilisierung der Gefäßwand. Sowohl die Verdickung als auch die Versteifung der Gefäßwand schützen vor einem nächsten Drucktrauma. Dabei geht es bei dieser maladaptiven Reaktion während der Neointimabildung primär um die Dickenzunahme und Versteifung des Gefäßes und nicht um einen Zugewinn der Kontraktionskraft durch GMZ, die hierbei ohnehin ausbleibt.

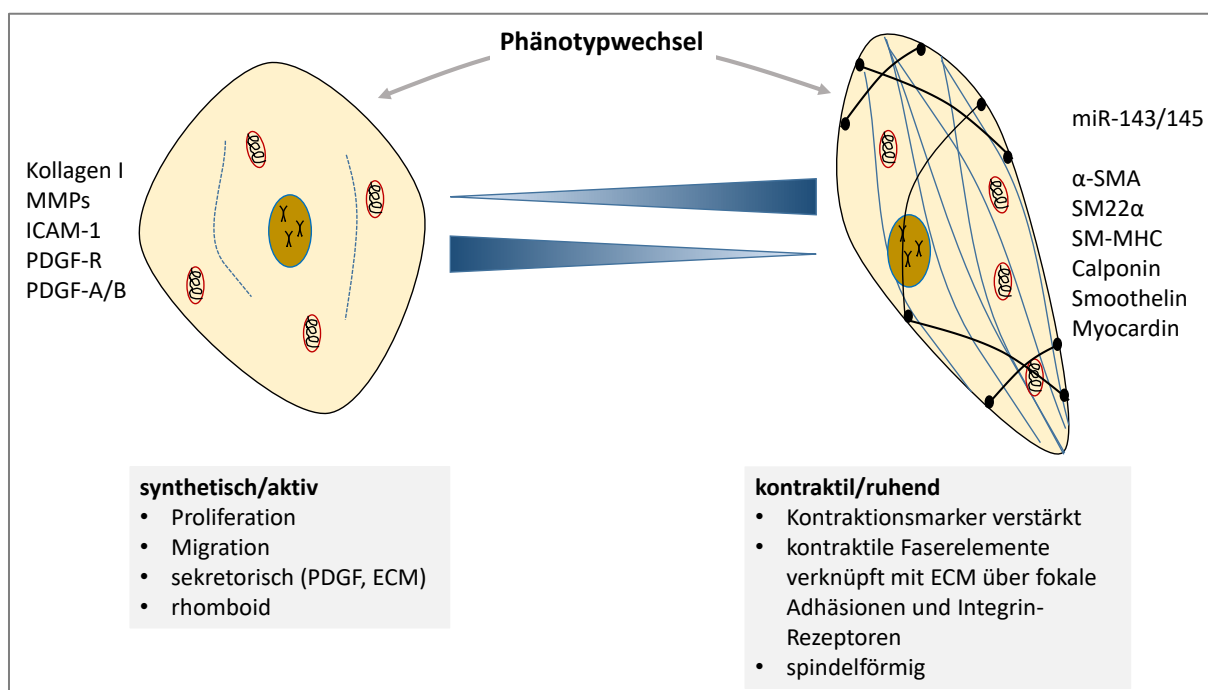
#### 4.2.3 Phänotypänderung glatter Gefäßmuskelzellen

Um das Gefäßsystem langfristig an Veränderungen des Blutdrucks anzupassen, besitzen GMZ der *Tunica media* eine hohe Plastizität. Dadurch können sie von einem überwiegend kontraktile, ruhenden Phänotyp in einen synthetischen, aktivierten Phänotyp und umgekehrt wechseln (s. Abbildung 2)<sup>26,27</sup>. In gesunden adulten Gefäßen herrscht vorwiegend der kontraktile, ruhende Phänotyp vor. Die GMZ proliferieren oder migrieren in diesem Zustand kaum<sup>28</sup>. Bei chronisch erhöhtem Blutdruck oder einer Gefäßverletzung, wie vorab beschrieben, können sie verstärkt hypertrophieren bzw. proliferieren und dieser Proliferation geht in der Regel eine verstärkte Migration voraus; darüber hinaus remodellieren die aktivierten GMZ die extrazelluläre Matrix<sup>26,29</sup>.

Dieser Phänotypwechsel spielt im Wesentlichen während der intimalen Hyperplasie eine wichtige Rolle. Synthetische GMZ setzen elastolytische Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) frei, die die Migration glatter Gefäßmuskelzelle aus der *Tunica media* in die sich ausbildende Neointima vereinfachen, indem sie Bestandteile der Basallamina degradieren und zur Auflösung von Zell-Zellkontakten führen<sup>30</sup>. GMZ können zudem selbst die extrazelluläre Matrix (EZM) in ihrer Struktur,



Form und Zusammensetzung beeinflussen. Dazu vermehren sie sich in der EZM durch Proliferation und synthetisieren Kollagen und Fibrin bzw. Fibronectin, Proteoglykane<sup>26,31</sup> und Cadherine<sup>26,32,33</sup>.



**Abbildung 2 Phänotypwechsel glatter Gefäßmuskelzellen.** Der synthetische Phänotyp zeichnet sich durch die Synthese von Kollagen I, MMPs, ICAM-1, PDGF-R und PDGF-A/B aus. Die MicroRNAs miR-143/145 regulieren dabei den Phänotypwechsel auf transkriptioneller Ebene, indem sie die Aktivität von Myocardin beeinflussen. Der kontraktile Phänotyp weist die verstärkte Synthese von Proteinen des kontraktile Apparates wie α-SMA, SM22α, SM-MHC, Calponin, Smoothelin und Myocardin auf. Zellen des kontraktile Phänotyps definieren sich zudem über eine verstärkte Ausbildung von Elementen des kontraktile Apparates wie Aktinfilamente und zeigen somit verstärkt auch Änderungen in der Anordnung des Zytoskeletts. (nach Milewicz, Owens, Rensen und Davis-Dusenbery<sup>26,34–36</sup>).

Die Morphologie von GMZ gibt einen ersten Hinweis auf den Phänotyp. Der kontraktile Phänotyp zeichnet sich durch eine spindelförmig elongierte Morphologie aus. Der aktivierte, synthetische Phänotyp ist gekennzeichnet durch eine rhomboide oder epitheloide Morphologie.

Der Phänotyp von GMZ wird nicht durch die Anwesenheit von bestimmten Proteinen charakterisiert, sondern vielmehr durch die zunehmende Abwesenheit von Markerproteinen für den kontraktile Phänotyp<sup>35</sup>. Diese Zellen exprimieren z.B. *α-smooth muscle actin* (α-SMA), *smooth muscle-myosin heavy chain* (SM-MHC), *smooth muscle 22-α* (SM22α) und Calponin<sup>26,27</sup>. GMZ des synthetischen Phänotyps zeigen eine deutlich verminderte Synthese der zuvor genannten Markerproteine (s. Abbildung 2). Gleichzeitig weisen sie eine verstärkte Synthese von Matrix-Metalloproteinasen wie MMP2 und MMP9, Kollagen I, ICAM-1, des PDGF Rezeptors (PDGF-R) und dessen Liganden PDGF-A/B auf<sup>30,35</sup>.

Die für die erwähnten Differenzierungsmarker kodierenden Gene besitzen Promotor-/Verstärkerregionen mit einem gemeinsamen *cis*-Element. Dieses *cis*-Element enthält neben dem *transforming growth factor beta* (TGFβ) Element mehrere CC(A/T-reiche)6GG (CARG) Elemente, sogenannte CARG-Boxes. Die für die vorgenannten Differenzierungsmarker kodierenden Gene besitzen

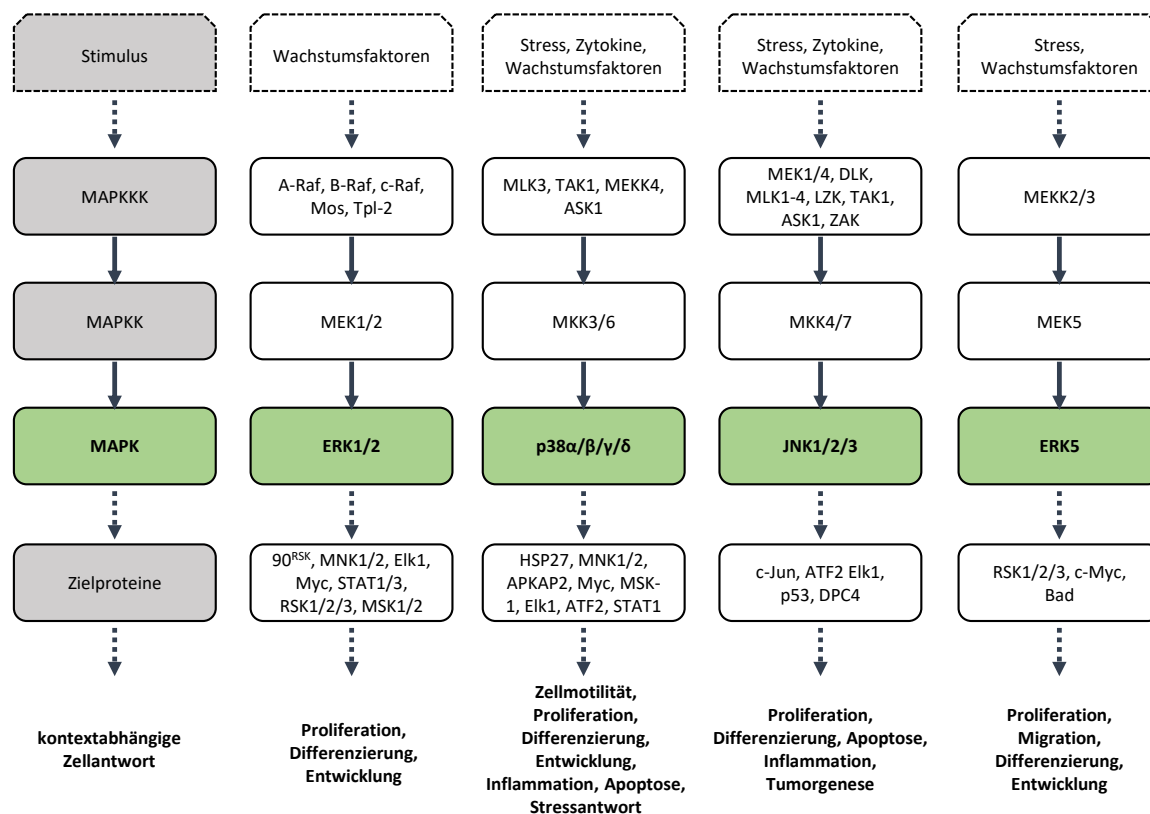
alle mehrere dieser CARG-Boxes, die wiederum eine Konsensusregion für die Bindung des *serum response factors* (SRF) besitzen.

Ein Coaktivator des SRF auf transkriptioneller Ebene ist Myokardin. Myokardin wiederum wird assoziiert mit der Expression von Genen, die für Komponenten des kontraktile Apparates der GMZ kodieren<sup>28,37,38</sup>. Die Aktivität von Myokardin wird auf Expressionsebene durch die Transkriptionsfaktoren *ETS domain-containing protein* (Elk1) und den *Krüppel-like factor-4* (KLF-4) gehemmt. Hierfür binden Elk-1 und KLF-4 kompetitiv an die DNA-Bindedomäne von Myokardin, hier SRF. Die Bindung von Elk1 und KLF-4<sup>39</sup> an SRF hemmt die Bindung von Myokardin an SRF und dadurch die nachfolgende Expression der Gene, die für Proteine des kontraktile Apparates kodieren<sup>40</sup>. Beide Faktoren, sowohl Elk1 als auch KLF-4 können wiederum durch die microRNAs miR-145 und miR-143 gehemmt werden<sup>41,42</sup>. Dadurch ermöglichen sie die Expression von Genen, die für Proteine des kontraktile Apparates kodieren, die unter der Kontrolle des Myokardin/SRF-Transkriptionsfaktor-Komplexes exprimiert werden. Insbesondere nach Gefäßverletzung wurde eine erhöhte Abundanz beider microRNAs beobachtet<sup>41</sup>.

#### 4.2.3.1 Einfluss von MAP-Kinasen auf den Phänotypwechsel glatter Gefäßmuskelzellen

Signaltransduktionswege, die die Proliferation und Migration von GMZ auf Transkriptionsebene einleiten, implizieren häufig *mitogen-activated protein* (MAP) Kinasen (Abbildung 3, grün). Die Signalkaskaden der MAP-Kinasen in der Zelle führen über die klassische *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2), die *c-Jun N-terminal/stress-activated protein kinase* (JNK/SAPK), die p38-MAP-Kinase und die ERK5. Dabei wird jeder Signaltransduktionsweg durch mindestens drei Effektormoleküle bestimmt. So leitet eine MAP-Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) ein Signal weiter an eine MAP-Kinase Kinase (MAPKK) und diese leitet es weiter an eine MAP-Kinase (Abbildung 3). Die

Signalwirkung kann dadurch nicht nur einfach weitergeleitet werden, sondern auch verstärkt oder verzögert werden<sup>43</sup>. Die einzelnen Kinasen wirken im Zytosol und im Zellkern<sup>44–48</sup>.



**Abbildung 3 Zusammenfassende Darstellung der MAP-Kinase-Signalwege.** Unterschiedliche Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Stress und Zytokine leiten unterschiedliche Signalkaskaden ein. Die einzelnen MAP-Kinasen ERK1/2, p38, JNK und ERK5 werden wiederum durch unterschiedliche Effektormoleküle aktiviert, bis sie über Zielproteine wie Elk1, Myc, c-Jun oder Bad diverse zelluläre Prozesse wie Zellproliferation und Inflammation antreiben (Verändert nach Roux, Zhang, Izawa *et al.*<sup>43,47,200</sup>).

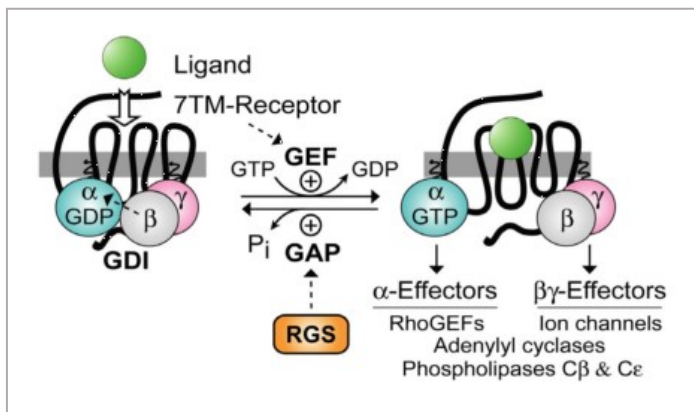
### 4.3 Steuerung von Signalwegen durch G-Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen

Die größte Gruppe der signalweiterleitenden Zelloberflächenmoleküle, die auch die MAP-Kinasen-Signalwege steuern, umfasst heptahelikale Rezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind, die Guanosintriphosphat (GTP) binden. Zahlreiche zelluläre Prozesse im vaskulären System, wie die Kontraktion, Proliferation und Migration von GMZ werden durch G-Protein-abhängige Signalkaskaden beeinflusst. Viele dieser intrazellulären Signalkaskaden werden ausgelöst durch die Bindung von Neurotransmittern, Hormonen, Phospholipiden, Peptiden und Glykopeptiden an diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs).

**Funktionelle Einheiten:** Ein GPCR-gebundener Signalverlauf (s. Abbildung 5) setzt die Interaktion von drei funktionellen Einheiten voraus. Diese Interaktionseinheiten sind der Rezeptor, an den der Ligand bzw. Agonist aus dem extrazellulären Raum bindet, das heterotrimere, membranständige G-Protein, das sich wiederum differenzieren lässt in eine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit und das Effektormolekül, das die intrazelluläre Signaltransduktion vorantreibt (Abbildung 4).

Während die Liganden, wie bereits oben erwähnt, variieren, vereinen die GPCRs eine konservierte tertiäre Struktur, bestehend aus sieben Transmembrandomänen (7TM), die sowohl intra- als auch extrazelluläre Schleifen bilden. Für das kardiovaskuläre System relevante GPCRs sind Angiotensin-, Endothelin-, Sphingosin-1-Phosphat-, Lysophospholipid-, Chemokin- und Bradykinin-Rezeptoren sowie die sogenannten Adrenozeptoren<sup>49,50</sup>.

Im kardiovaskulären System lassen sich die rezeptorgekoppelten G-Proteine, in die  $G\alpha$ -Untereinheiten  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  und  $G\alpha_{12/13}$ , fünf  $G\beta$ - und zwölf  $G\gamma$ -Untereinheiten kategorisieren<sup>51,52</sup>. Diese Untereinheiten sind im inaktiven Zustand gebunden an Guanosindiphosphat (GDP). Sobald ein Agonist mit dem entsprechenden Rezeptor interagiert, wird die  $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert, indem das gebundene GDP durch ein Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt wird (Abbildung 4). Die so aktivierte Untereinheit löst sich von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit und interagiert nun mit dem Effektor, um

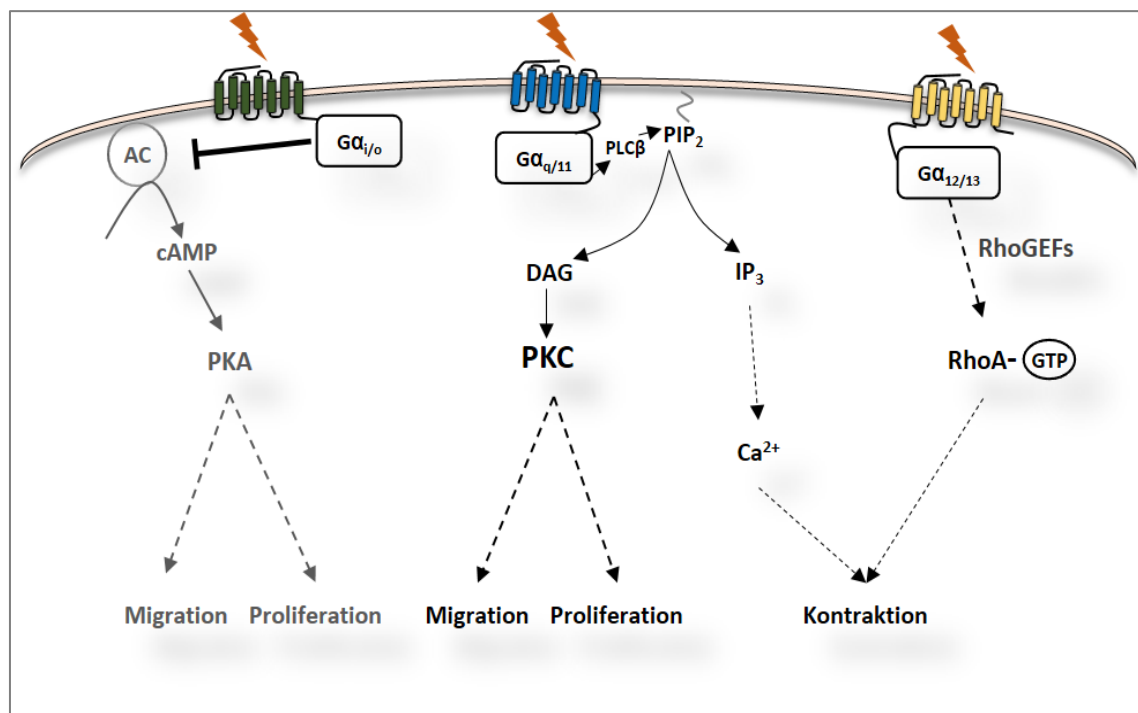


**Abbildung 4 Schematische Abfolge des GDP/GTP-Austausches an  $G\alpha$ -Untereinheiten von GPCRs.** Durch RGS-Proteine wird die  $G\alpha$ -Untereinheit durch die Abspaltung eines Phosphatrests ( $P_i$ ) vom gebundenen Guanosintriphosphat (GTP) inaktiviert und agiert dadurch als GTPase-verstärkende Proteine (GAP). Durch den Austausch von gebundenem Guanosindiphosphat (GDP) durch GTP, wird die  $G\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit getrennt und aktiviert. Solche Austauschproteine werden GEFs genannt. Aktivierte Untereinheiten können dann mit nachgeschalteten Effektormolekülen interagieren<sup>64</sup>.

unterschiedliche Signalkaskaden auszulösen. Diese Reaktionskette wird wieder eingestellt durch die intrinsische Eigenschaft der  $G\alpha$ -Untereinheit ihr gebundenes GTP durch Hydrolyse in GDP umzuwandeln. An GDP gebunden nimmt es wieder seine ursprüngliche Konformation mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit ein.

Obwohl es zahlreiche GPCRs gibt und noch mehr Liganden, die GPCRs mit unterschiedlichen Untereinheiten aktivieren können, sind die beteiligten Effektormoleküle für den nachgeschalteten Signalweg weitestgehend spezifisch. So bindet Adrenalin an  $G\alpha_q$ -,  $G\alpha_s$ - und  $G\alpha_{i/o}$ -gebundene GPCRs<sup>52,53</sup>. Gleiches gilt für die Aktivierung der GPCRs durch Ang II oder ET-1 und der daraus resultierenden Aktivierung der  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheit<sup>52</sup>. Der von der  $G\alpha$ -Untereinheit angesteuerte Effektor determiniert die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade. Während es bei  $G\alpha_q$  die Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) ist, ist es bei  $G\alpha_s$  und  $G\alpha_{i/o}$  die Adenylatzyklase (AC). Die AC-Isoform AC1 wird dabei durch  $G\alpha_i$  und  $G\alpha_o$  inhibiert, während die Isoformen AC5 und AC6 durch  $G\alpha_i$  gehemmt werden. Die Isoformen AC1-9 werden allerdings alle von  $G\alpha_s$  aktiviert<sup>54</sup>. Bei  $G\alpha_{12/13}$  sind es oftmals unterschiedliche *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs), die den eigentlichen Effektor RhoA durch GTP-Kopplung aktivieren<sup>52</sup> (Abbildung 5). Zu diesen RhoGEFs, die entweder durch beide  $G\alpha$ -Untereinheiten,  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$ , aktiviert werden, wie das *leukemia-associated RhoGEF* (LARG) oder nur

durch aktives  $G\alpha_{13}$  wie das p115-RhoGEF und *PSD-9/Disc-large/ZO-1* homology RhoGEF (PDZ-RhoGEF). Nur durch  $G\alpha_{12}$  reguliert wird das *lymphoid blast crisis* RhoGEF (Lbc-RhoGEF)<sup>55</sup>.



**Abbildung 5 Schematische Darstellung der  $G\alpha_{i/o}$ -,  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{12/13}$ -abhängigen Signalkaskaden.** G-Protein-abhängige Signalwege (hier  $G\alpha_{i/o}$ -,  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{12/13}$ -abhängig) werden aktiviert durch die Interaktion unterschiedlicher Stimuli (brauner Blitz) mit GPCRs (grün) und wirken in glatten Gefäßmuskelzellen in einem weiteren Signalverlauf durch ihre Effektorproteine auf zelluläre Prozesse wie die Proliferation, Migration und Kontraktion. Die gestrichelten Pfeile zeigen an, dass der jeweils folgende Signalabschnitt noch weitere Zwischenstadien beinhaltet, die hier aufgrund der Komplexität reduziert wurden (erstellt nach Wettschureck und Offermanns<sup>52</sup>).

**GPCR-Deaktivierung:** Die Deaktivierung der GPCRs unterliegt unterschiedlichen Regulationsmechanismen. Hierzu zählen die Desensibilisierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und Sekundärbotenstoff-abhängige Kinasen wie die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC). GRKs inaktivieren GPCRs durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten an intrazellulären Carboxyldomänen der GPCR-Transmembrandomänen<sup>56,57</sup>. Durch diese Phosphorylierung kann  $\beta$ -Arrestin an die  $G\alpha$ -Bindestelle binden, sodass die aktivierte  $G\alpha$ -Untereinheit nicht mehr an das GPCR binden kann und somit die erneute Aktivierung des GPCR durch Agonisten arretiert wird<sup>49,58</sup>. Die Terminierung der GPCR-Aktivität verläuft in Abhängigkeit von der Agonistenkonzentration unterschiedlich. So können GRKs, PKA und PKC bei niedriger Agonistenkonzentration zur einfachen Blockade des GPCR durch Phosphorylierung und Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin führen. Dies hat eine Desensibilisierung zur Folge. Bei erhöhter Agonistenkonzentration können GRKs durch die Phosphorylierung des GPCR diesen vom G-Protein lösen und an  $\beta$ -Arrestin binden. Letzteres löst dann eine weitere Signalkaskade zum Internalisieren des Rezeptors durch Clathrin-Vesikel aus und bereitet so den endosomalen Transport der Rezeptoren aus der Zelle vor. Alternativ kommt es zur transienten Internalisierung und Dephosphorylierung des Rezeptors und der

erneuten Einbindung in die Zellmembran<sup>49,58</sup>. Sobald eine langanhaltende Agonistenbindung vorliegt, greifen Regulationsmechanismen auf transkriptioneller Ebene, die entweder die Rezeptor-Genexpression unterdrücken oder die mRNA destabilisieren<sup>49</sup>.

#### 4.3.1 Ausgewählte G-Protein-vermittelte Signalwege

**Kalzium-abhängige G-Protein-vermittelte Signalwege in GMZ:** Zu den GPCR-abhängig ausgelösten Signalwegen gehört die bereits an anderer Stelle beschriebene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kontraktion und Relaxation von GMZ (s. 4.1.3). Zur Kontraktion führt die Aktivierung der GPCR-Untereinheit  $\text{G}\alpha_{q/11}$  durch die Bindung von Noradrenalin, ET-1 und Ang II an den entsprechenden Rezeptor. Noradrenalin, aber auch Adrenalin in höheren Konzentrationen, binden dabei an den  $\alpha 1$ -Adrenozeptor, während ET-1 und Ang II vorzugsweise an den  $\text{ET}_A$ -Rezeptor bzw. den  $\text{AT}_1$ -Rezeptor binden.

**Kalzium-unabhängige G-Protein-vermittelte Signalwege in GMZ:** Neben der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen phasischen Kontraktion über  $\text{IP}_3$ , führt die Spaltung von  $\text{PIP}_2$  über DAG zur Aktivierung der PKC und dadurch zu einer tonischen Kontraktion ohne dafür zwangsläufig  $\text{Ca}^{2+}$  zu benötigen<sup>7,59</sup> (s. 4.1.3). Allerdings treibt PKC als Effektormolekül des  $\text{G}\alpha_{q/11}$ -abhängigen Signalwegs noch weitere Signalkaskaden an. Neben der *calmodulin-dependent protein kinase II* (CamKII) phosphoryliert es noch die Rho-Kinase p160ROCK und ERK1/2<sup>7</sup>, die u.a. in die Zellproliferation und -Migration<sup>60</sup> eingreifen können. Eine Aktivierung des  $\text{ET}_A$ -Rezeptors führt auch über den  $\text{G}\alpha_{12/13}$ -gebundenen Signalweg und die RhoA/Rho Kinase (ROCK)-Achse zur andauernden Muskelzellkontraktion<sup>7,61,62</sup>. Die aktive Untereinheit  $\text{G}\alpha_{12/13}$  führt durch die Aktivierung von RhoGEFs als Effektormoleküle zur Kopplung von GTP an RhoA. Dadurch wird RhoA aktiviert, diese aktiviert schließlich ROCK, die u.a. die katalytische Untereinheit der MLCP phosphoryliert und diese dadurch inhibiert. Das hält die Phosphorylierung der MLC und damit die tonische Kontraktion der GMZ<sup>7,61</sup> ebenfalls aufrecht.

**Zusätzliche RhoA-vermittelte GPCR-abhängige Signalwege in GMZ:** RhoA kann auch durch den  $\text{G}\alpha_{q/11}$ -abhängigen GEF p63RhoGEF aktiviert werden und steht damit im Mittelpunkt einer  $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten-übergreifenden Kommunikation innerhalb der Zelle. GEFs, zu denen die  $\text{G}\alpha_{12/13}$ -abhängigen RhoGEFs wie p115 RhoGEF und das *leukemia associated RhoGEF* LARG zählen, beschleunigen den Guanosin-Austausch. Dadurch können sie die zelluläre Antwort auf mechanische Krafteinwirkung und die folgende Zellsteifigkeit<sup>63</sup> mitbestimmen. Daneben existieren GAPs, zu denen auch die RhoGAPs, wie ARHGAP9, p115 und p190 gehören, die diese GEF-Aktivität durch die Hydrolyse des Rho-GTP G-Protein-spezifisch<sup>64,65</sup> wieder aufheben können und ebenfalls abhängig von der G-Proteinaktivität sind (Abbildung 4)<sup>66</sup>. Die Inaktivierung von RhoA kann neben den aktiven GAPs außerdem durch die Hemmung des GDP/GTP-Austauschs durch so genannte *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDI) erfolgen<sup>64,67</sup>.

**Adenylatzyklase-abhängige GPCR-vermittelte Signalwege in GMZ:** Der Effektor der antagonistisch wirkenden  $G\alpha_s$ - und  $G\alpha_{i/o}$ -Signalwege ist die Adenylatzyklase (AC), die bei Aktivität der  $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit inhibiert wird, während sie bei Aktivität der  $G\alpha_s$ -Untereinheit stimuliert wird. Die aktive Adenylatzyklase bildet zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Abspaltung eines Pyrophosphatrests von Adenosintriphosphat (ATP). PKA liegt im inaktiven Zustand als Holoenzym aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten vor. Durch die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten, werden die katalytischen Einheiten zur Substratphosphorylierung abgespalten<sup>68</sup>. Diese katalytischen Einheiten können in weiteren Signalschritten die MAPK ERK1/2 (s. Abbildung 3) dephosphorylieren und dadurch hemmen. Dieser Weg führt hauptsächlich über die Proteinkinase *proto-oncogene c-RAF* (RAF-1). Gleichzeitig kann PKA ERK1/2 durch eine weitere Proteinkinase B-Raf aktivieren und dadurch auch den Zellzyklus der GMZ beeinflussen<sup>69,70</sup>. Zusätzlich kann PKA den  $G\alpha_s$ -gekoppelten  $\beta_2$ -Adrenozeptor phosphorylieren. Die Bindung der  $G\alpha_s$ -Untereinheit am GPCR wird dadurch aufgehoben, sodass  $G\alpha_{i/o}$  binden kann, eine über Src/Ras/Raf-1-geführte Signaltransduktion darauffolgend MEK und ERK aktiviert und damit u.a. in die Zellproliferation<sup>69</sup> eingreifen kann, um nur einige Beispiele zur Komplexität der GPCR-vermittelten Signalwege zu nennen.

#### 4.3.2 G-Protein-vermittelte Signalwege in der Neointimabildung

Während des arteriellen Remodellierungsprozesses im Rahmen einer Neointimabildung kommt es zur Apoptose, Migration und Proliferation der GMZ der *Tunica Media* (s. 4.2.2), sowie zum Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix<sup>71</sup>. Diese Prozesse setzen einen Phänotypwechsel der GMZ vom kontraktile zum synthetischen Phänotyp voraus.

**Proliferation und Migration:** Dieser Phänotypwechsel kann initiiert werden durch  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{i/o}$  und  $G\alpha_{12/13}$ -vermittelte Signaltransduktion. Häufig beteiligt an der initialen Differenzierung von GMZ sind neben Faktoren der EZM, der Myokardin/SRF-, KLF-4/SRF- und Elk-1/SRF-Transkriptionsfaktor-Komplex, ERK1/2, NADPH-Oxidase 4 und reaktive Sauerstoffspezies wie  $O_2^{-72}$ . Hierbei unterstützen Myokardin und Myokardin-verwandte Co-Aktivatoren wie MRTF-A und MRTF-B die Differenzierung von GMZ, indem sie die Expression der Genprodukte, die für den kontraktile Phänotyp charakteristisch sind (SM-MHC,  $\alpha$ -SMA), hemmen. Gleichzeitig konkurrieren TCFs wie Elk-1 mit Myokardin oder den MRTFs um die Komplexbildung mit SRF<sup>27</sup>. Während die Aktivität der TCFs über den Ras/MAPK Signalweg von der Aktivität der  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit abhängt, agieren MRTFs über den RhoA- und damit  $G\alpha_{12/13}$ -kontrollierten Signalweg. In die verstärkte Kontraktion von GMZ in der Initialphase der Hypertonie sind die  $G\alpha_{12/13}$ - und  $G\alpha_{q/11}$ -Signalwege eingebunden. Dabei treibt  $G\alpha_{12/13}$  die Differenzierung von GMZ zum kontraktile Phänotyp an, während  $G\alpha_{q/11}$  die Proliferation antreibt und dadurch den synthetischen Phänotyp aufrecht erhält<sup>73</sup>. Daneben wirkt die über die

Aktivität der  $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit gehemmte cAMP/PKA Signaltransduktion in aortalen GMZ proliferationsinhibierend<sup>74–76</sup>.

**Auf- und Abbau der EZM:** Der Umbau der EZM durch synthetische GMZ z.B. beim Hypertonie-induzierten Arteriellen Gefäßwandumbau geht in großen Arterien einher mit einer Verminderung des Elastinanteils und einer erhöhten Kollagen I Produktion. Ang II treibt die glattmuskelzellbedingte Produktion von Kollagen I und die Genexpression von Prokollagen Typ 1 über den ERK1/2-Signalweg an. Aktivierte  $AT_2$ -Rezeptoren führen über die Aktivität der  $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit ebenfalls zur Produktion von Kollagen I durch GMZ<sup>77</sup>. Ebenfalls zur Kollagen I-Bildung führt die Bindung von ET-1 an den  $ET_A$ -Rezeptor und die Aktivierung von RhoA und ROCK<sup>78</sup>.

#### 4.4 Regulation der Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit durch RGS-Proteine

Einmal aktiviert unterliegt die GPCR-abhängige Signaltransduktion einigen, bereits erwähnten Regulationsmechanismen, die die Signalkaskaden der  $G\alpha$ -Untereinheiten terminieren. Zu diesen gehört die intrinsische Hydrolyseeigenschaft der  $G\alpha$ -Untereinheiten, die durch RGS-Proteine bis zu 1000-fach beschleunigt werden kann<sup>52,79–81</sup> (s. Abbildung 4).

RGS-Proteinen ist eine 120-130 Aminosäuren umfassende RGS-Domäne gemein. Diese Domäne ist es auch, die an die GTP-gebundene  $G\alpha$ -Untereinheit spezifisch bindet. Die RGS- und RGS-ähnlichen Proteine, die RGS-Homologiedomänen besitzen, werden nach ihrer Aminosäuresequenz, der allgemeinen Proteinstruktur und ihrer bisher bekannten Funktion in unterschiedliche Subfamilien gegliedert (Besonders erforscht wurden bis dato GAP-Funktionen in Bezug auf  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  und  $G\alpha_{12/13}$ . Die GAP-Aktivität der RGS-Proteine erfolgt dabei selektiv. Während die Proteine der Subfamilie F/GEF hauptsächlich die  $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten hydrolysieren, sind die C/R7 und D/R12 Subfamilien begrenzt auf die  $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit. Die B/R4-Subfamilie kann  $G\alpha_{i/o}$  und  $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheiten mit unterschiedlicher Bindungsaffinität der jeweiligen RGS-Proteine inhibieren. Die B/R4-Mitglieder, z.B. RGS5 und RGS16, weisen trotz struktureller Ähnlichkeiten Unterschiede in ihrer Inhibitionsfähigkeit auf die G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit und deren Isoformen i und o, q und 11 sowie 12 und 13 auf (Tabelle 1). RGS5 zeigt eine gleichwertige Inhibition von  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_i$  und  $G\alpha_o$  und eine etwas schwächere Bindungsaffinität zur  $G\alpha_{11}$ -Untereinheit<sup>82–84</sup>. RGS16 zeigt jedoch eine im Vergleich zu RGS5 schwächere Bindung und Hemmung von  $G\alpha_{11}$ ,  $G\alpha_i$  und  $G\alpha_o$ , allerdings eine stärkere Hemmung der  $G\alpha_q$ -Untereinheit<sup>82,83,85–87</sup>. Während bisher über RGS5 keine Wirkung auf  $G\alpha_{12/13}$  berichtet wurde, gibt es inzwischen Nachweise zur RGS16-bedingten  $G\alpha_{12/13}$ -Inhibition<sup>86</sup>). Diese Subfamilien umfassen die Subfamilie A/RZ (RGS22/RGS17, GAIP/RGS19, RGS21/RGS20, Ret-RGS1), B/R4 (RGS1-5, 8, 13, 16, 18, 21), C/R7 (RGS6, 7, 9, 11), D/R12 (RGS10, 12, 14), E/RA (Axin, Conductin) und F/RL (RGS-ähnliche Proteine wie RhoGEFs, GRKs, A-Kinase Ankerproteine und *sorting nexins* (SNXs). Letztere wird in einigen Publikationen<sup>82</sup> in vier Subfamilien, F/GEF (p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF, LARG), G/GRK (GRK1-

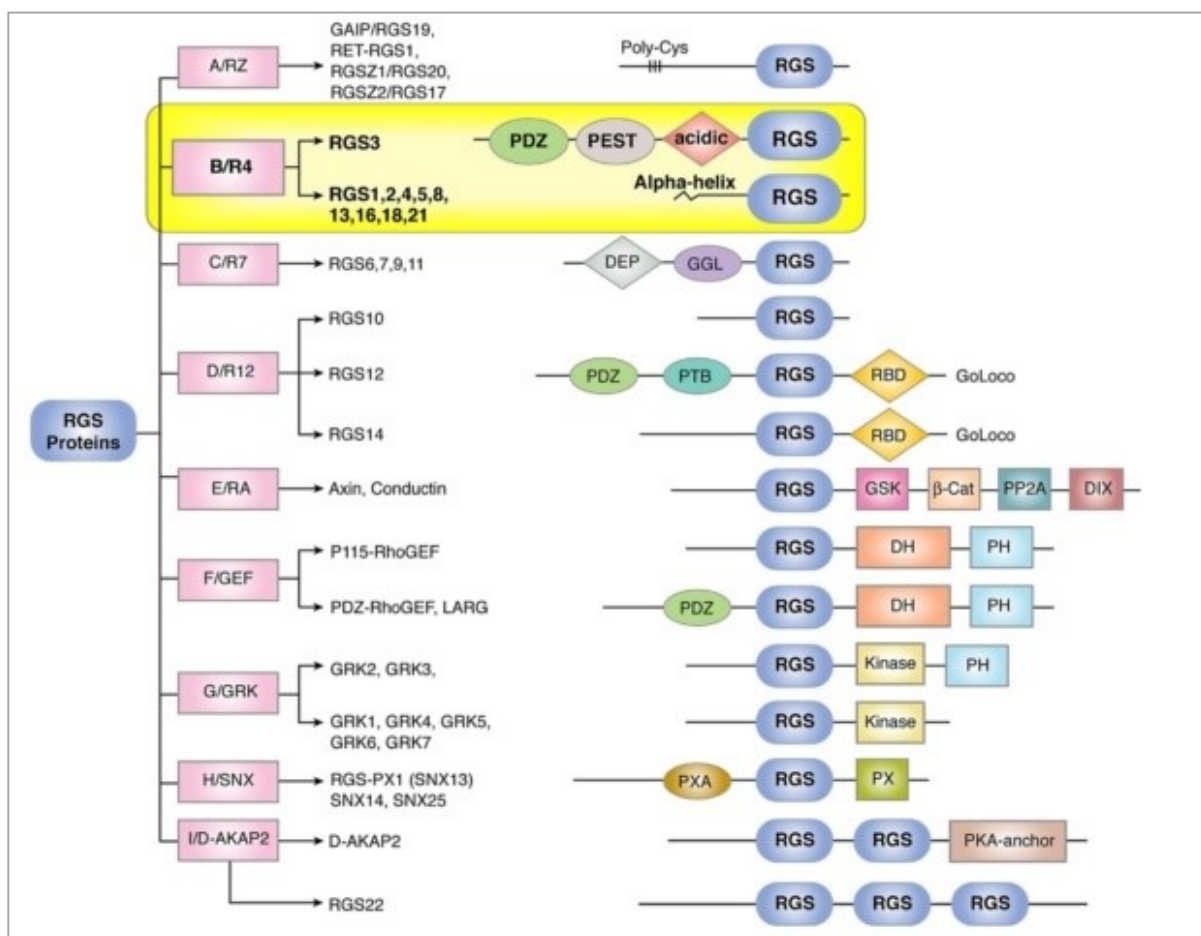


---

7), H/SNX (RGS-PX1 (SNX13), SNX14, 15) und I/D-AKAP2 (D-AKAP2, RGS22), untergliedert. Während die RGS-Proteine der Subfamilien C/R7, D/R12, E/RA und F/RL eine Größe von bis zu 160 kDa haben, gehören zur A/RZ und B/R4 Subfamilie Proteine, die eine Größe von 20-30 kDa haben. Diesen Proteinen sind eine kurze N-terminale Region und die C-terminale RGS-Domäne gemeinsam. Die Ausnahme hierbei bildet RGS3<sup>49,82</sup>.

Insbesondere die RGS-Subfamilie B/R4, die auch die kleinsten RGS-Proteine umfasst, zeichnet sich strukturell dadurch aus, dass sie alle bis auf RGS3 eine aminoterminal, amphipatische Alpha-Helix besitzen. Die Mitglieder der A/RZ-Subfamilie vereint ein Polycystein-reicher Aminoterminus.

Bis auf Proteine der E/RA und RGS-ähnlichen Proteine, hier mit Ausnahme der RhoGEFs, besitzen alle RGS-Proteine eine GAP-Funktion. Die GAP-Aktivität der RGS-Proteine setzt eine Konformationsänderung des Gα-GTP-Komplexes voraus. Die Struktur der aktiven Form der Gα-Untereinheit begünstigt die Anbindung an die sogenannte *switch*-Region der Untereinheit und dessen Hydrolyse durch die RGS-Domäne der RGS-Proteine.



**Abbildung 6 Schematische Strukturdarstellung der RGS-Proteine.** Gelistet sind die RGS-Subfamilien (links) und ihre Mitglieder (Mitte). Die für einzelne Subfamilien charakteristische Domänenstruktur (rechts) definiert die Interaktionsfähigkeit mit Interaktionspartnern, wie G-Proteinen, GTPasen und GPCRs und die GAP-Aktivität. Die B/R4-Subfamilie mit Ausnahme von RGS3, stellt den Grundaufbau, bestehend aus der RGS-Domäne und einer amphipatischen Helix und somit die strukturell kleinste RGS-Familie dar. Weitere Domänen spezifizieren einzelne Subfamilien in Hinblick auf ihre Fähigkeit sich in der Membran zu verankern oder durch ihre Interaktionsfähigkeit mit anderen Proteinen zusätzliche Wirkungen neben der GAP-Aktivität zu erzielen<sup>82</sup>.

Besonders erforscht wurden bis dato GAP-Funktionen in Bezug auf  $G_{\alpha_{i/o}}$ ,  $G_{\alpha_{q/11}}$  und  $G_{\alpha_{12/13}}$ . Die GAP-Aktivität der RGS-Proteine erfolgt dabei selektiv. Während die Proteine der Subfamilie F/GEF hauptsächlich die  $G_{\alpha_{12/13}}$ -Untereinheiten hydrolysieren, sind die C/R7 und D/R12 Subfamilien begrenzt auf die  $G_{\alpha_{i/o}}$ -Untereinheit. Die B/R4-Subfamilie kann  $G_{\alpha_{i/o}}$  und  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Untereinheiten mit unterschiedlicher Bindungsaffinität der jeweiligen RGS-Proteine inhibieren. Die B/R4-Mitglieder, z.B. RGS5 und RGS16, weisen trotz struktureller Ähnlichkeiten Unterschiede in ihrer Inhibitionsfähigkeit auf die G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit und deren Isoformen i und o, q und 11 sowie 12 und 13 auf (Tabelle 1). RGS5 zeigt eine gleichwertige Inhibition von  $G_{\alpha_q}$ ,  $G_{\alpha_i}$  und  $G_{\alpha_o}$  und eine etwas schwächere Bindungsaffinität zur  $G_{\alpha_{11}}$ -Untereinheit<sup>82-84</sup>. RGS16 zeigt jedoch eine im Vergleich zu RGS5 schwächere Bindung und Hemmung von  $G_{\alpha_{11}}$ ,  $G_{\alpha_i}$  und  $G_{\alpha_o}$ , allerdings eine stärkere Hemmung der  $G_{\alpha_q}$ -Untereinheit<sup>82,83,85-87</sup>. Während bisher über RGS5 keine Wirkung auf  $G_{\alpha_{12/13}}$  berichtet wurde, gibt es inzwischen Nachweise zur RGS16-bedingten  $G_{\alpha_{12/13}}$ -Inhibition<sup>86</sup>.

Tabelle 1 Literaturbasierte Gegenüberstellung von RGS5 und RGS16 in ihrer Affinität zur Inhibition unterschiedlicher G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten

RGS Protein	Inhibition $G\alpha_q$	Inhibition $G\alpha_{11}$	Inhibition $G\alpha_i$	Inhibition $G\alpha_o$	Inhibition $G\alpha_{12}$	Inhibition $G\alpha_{13}$	Literatur-nachweise
<b>RGS5</b>	++	+	++	++	-	-	(Ladds et al. 2007), (Bansal et al. 2007), (Furuya et al. 2004)
<b>RGS16</b>	+++	+	+	+	-	+++	(Ladds et al. 2007), (Bansal et al. 2007), (Beadling et al. 1999), (Johnson et al. 2003), (Slep et al. 2008)

RGS-Proteine besitzen neben ihrer GAP-Funktion noch weitere RGS-unabhängige Funktionen. Die erweiterten Domänen der C/R7 und D/R12 Subfamilien ermöglichen besondere Proteininteraktionsmöglichkeiten neben der genannten GAP-Aktivität. Axin aus der C/R7-Subfamilie hat Bindestellen für  $\beta$ -Catenin, GSK-3 $\beta$ , PP2A und Dishevelled, während RGS12 und 14 Ras-Bindedomänen besitzen<sup>64,88</sup>. Zudem werden die Mitglieder der B/R4 Subfamilie assoziiert mit einer inhibierenden Wirkung auf Isoformen der Adenylatzyklase, im Fall von RGS2 möglicherweise auch als Zusatzeffekt zur Interaktion mit  $G\alpha_s$ . RGS2, 3 und 4 inhibieren zusätzlich zu ihrer GAP-Aktivität die G-Protein-abhängigen Signalkaskaden, indem sie direkt PLC- $\beta$  hemmen und dies möglicherweise durch kompetitive Bindung an die  $G\alpha$ -Untereinheit erreichen<sup>49,81,89</sup>. Nicht nur die nachfolgenden Effektorproteine, sondern auch die Rezeptoren selbst können Interaktionspartner der RGS-Proteine sein. Unter Umständen besitzen Rezeptoren eine höhere Bindungsaffinität zum RGS-Protein als zum Liganden, wie es bei RGS4 und der Bindung an  $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren der Fall ist<sup>82</sup>.

Wie bereits erwähnt beinhalten die RGS-Proteine der A/RZ-Subfamilie jeweils einen Polycysteinereichen Aminotermus. Solche Regionen bieten die Möglichkeit zur postrationalen Modifikation wie Palmitoylierungen. Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, dass sich RGS4, RGS5 und RGS16 in den Cysteinpositionen ähneln und an dieser Stelle modifiziert werden können. Für RGS4 existieren kontroverse Aussagen über die palmitoylierungsbedingte GAP-Aktivität, die möglicherweise mit der Membranlokalisation einhergehen könnte<sup>90,91</sup>. Die Palmitoylierung schützt RGS4 vermutlich auch vor dem proteasomalen Abbau und führt zur Akkumulation von RGS4 in der Zelle, während sie bei RGS16 ausschlaggebend für die Funktion ist<sup>92</sup>. In einer weiteren Studie konnte für RGS4, RGS5 und RGS16 gezeigt werden, dass sie, bedingt durch eine Arginyltransferase, über den N-Terminus ubiquityliert werden können.

#### 4.4.1 Einfluss und Vorkommen der B/R4-RGS-Proteinsubfamilie im kardiovaskulären System

Die Funktionalität der RGS-Proteine wird bedingt durch ihr unterschiedlich ausgeprägtes Proteinvorkommen. Die B/R4-Subfamilienmitglieder RGS2, RGS4 und RGS5 kommen im kardiovaskulären System insbesondere in der Niere, im Herzen und in den Blutgefäßen verstärkt vor<sup>93</sup>.

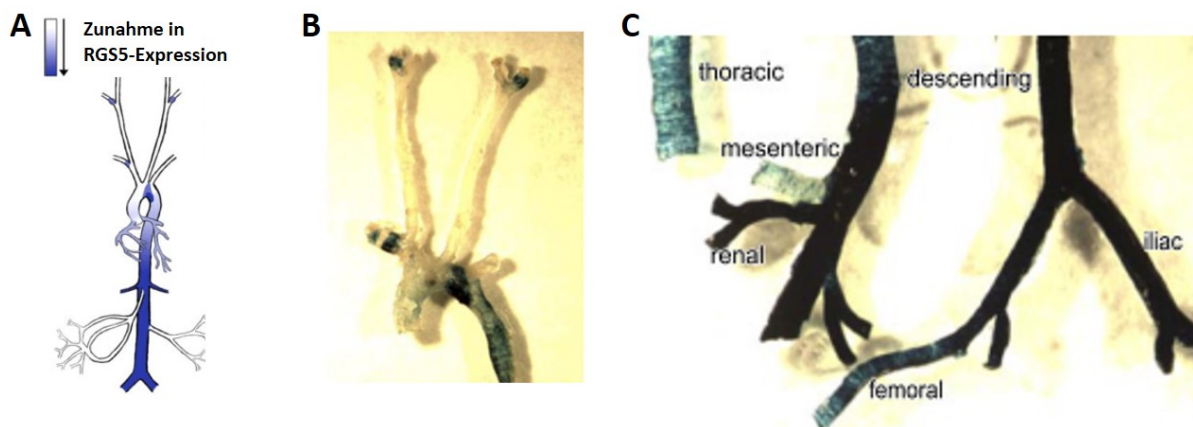
So werden die Proteine RGS2 und RGS4 häufig im Herzen lokalisiert, RGS4 und RGS5 herznah in den Koronararterien<sup>93</sup>. Im Gehirn kommen sowohl RGS2 als auch RGS5 gleichermaßen vor, wobei hier RGS5 mehr im cerebralen Cortex lokalisiert ist und RGS2 im zentralen Nervensystem und der Amygdala<sup>93</sup>. In der Niere wird RGS5 nahezu gar nicht detektiert, während RGS4 in mesengialen Zellen und GMZ vorkommt und RGS2 im Sammelrohr der Niere funktionell aktiv ist<sup>93</sup>.

Obwohl sich die genannten RGS-Proteine der B/R4 Subfamilie strukturell und funktionell weitestgehend ähneln und ihr Einfluss auf das kardiovaskuläre System in der aktuellen Literatur dokumentiert ist, gibt es diametral abweichende Aussagen über den Einfluss der RGS-Proteine RGS2 und RGS5 auf den Blutdruck, wenn transgene Mäuse verglichen werden. Während der reduzierte Blutdruck in RGS2-defizienten Mäusen über dessen  $G\alpha_{q/11}$ -inaktivierende Funktion unstrittig scheint<sup>94</sup>, bleibt die Blutdruckregulation in RGS5-defizienten Tieren kontrovers<sup>95,96</sup>. RGS4 kann durch  $G\alpha_{q/11}$ -Inhibition in Kardiomyozyten die Entstehung einer Herzhypertrophie hemmen, sofern RGS4 überexprimiert wird<sup>93</sup>.

Wenig ist bekannt über die transkriptionelle Regulation der RGS-Proteine, wobei das *Rgs2*-Gen Transkriptionsbindestellen u.a. für AP-1 und SRF besitzt<sup>97</sup>. Das *Rgs5*-Gen verfügt über Transkriptionsfaktorbindestellen wie Mef2a, Mef2c, C/EBP-beta, FOXO3a und NF-1<sup>97</sup>. Das *Rgs16*-Gen hingegen hat u.a. Transkriptionsfaktorbindestellen für AP-1, c-Jun und ATF-2<sup>98</sup>. Die RGS16 mRNA-Expression wird über den Tumorsuppressor p53 induziert<sup>99</sup>.

Neben dem Vorkommen des RGS5-Proteins in GMZ im arteriellen System, bestehen zahlreiche Untersuchungen zur RGS5-Genexpression im Blutgefäßsystem. Seki *et al.*<sup>100</sup> konnten die Expression der humanen RGS5 mRNA mittels Northern Blot-Verfahren u.a. hauptsächlich im Herzen, in der Lunge, in der Skelettmuskulatur, im Gehirn, in der Niere, der Plazenta und im Dünndarm nachweisen<sup>100</sup>. Manzur und Ganss<sup>101</sup> fügten desweiteren einen RGS5-RNA-Nachweis in glomerulären Mesengialzellen der Niere und in Kardiomyozyten hinzu. Unbestritten ist eine erhöhte RGS5 mRNA-Abundanz in Perizyten und GMZ<sup>102-104</sup>. Ebenfalls durch ein Northern Blot-Verfahren konnten Adams *et al.*<sup>105</sup> humanes Gewebe in Hinblick auf die RGS5-Genexpression untersuchen. Dabei beobachteten die Autoren eine starke RGS5-Genexpression in der Aorta und eine schwächere Expression in adulten Herzgewebeproben im Vergleich zum fötalen Herz. Zusätzlich stellten sie fest, dass die RGS5-Expression in den untersuchten Geweben den stärksten Expressionsunterschied zwischen Aorta und *Vena cava* hat. In den peripheren Arterien und Arteriolen<sup>106</sup> dominiert die RGS5-Genexpression in den arteriellen GMZ der *Tunica media* und *intima*<sup>94,103,107</sup>.

Zhang *et al.* untersuchten die RGS5-Genexpression in der Aorta genauer und stellten fest, dass sich die RGS5-Genexpression während der Entwicklung verändert und von einer gleichmäßig verteilten Genexpression im neonatalen Entwicklungsstadium von Mäusen zu einem mosaikartigen Expressionsmuster im adulten Stadium übergeht. Im adulten Tier unterscheidet sich die RGS5-Genexpression in unterschiedlichen arteriellen Gefäßbetten. Es zeigt sich eine stärkere RGS5-Expression in GMZ der abdominalen Aorta im Vergleich zur *A. carotis*. Die RGS5-Genexpression nimmt entlang der thorakalen Aorta hinab zur abdominalen Aorta zu (Abbildung 7 A). Zusätzlich ist sie konzentriert am Aortenbogen, der linken *A. subclavia* und den Abzweigungen zur *A. carotis communis dextra* und *sinistra* (Abbildung 7 B). Sie nimmt dann über die posterior-anteriore Achse der abgehenden Aorta bis hin zu den Nierenarterien, der *A. femoralis*, der *A. mesenterica* und der *A. iliaca communis* zu (Abbildung 7 C). Wobei die Expression in der distalen *A. femoralis* und der *A. mesenterica* vergleichsweise etwas geringer ist<sup>108</sup>.



**Abbildung 7 Verteilung der RGS5-Genexpression in adulten Mäusen.** A) Die Schematische Darstellung verdeutlicht die Verteilung und Zunahme der RGS5-Expression in glatten Gefäßmuskulzellen in der thorakalen Aorta zunächst in Mosaikform, B) konzentriert am Aortenbogen, der linken *Arteria subclavia* und den Abzweigungen zur *Arteria carotis communis dextra* und *sinistra* und flächendeckend im Verlauf der posterior-anterioren Achse der abgehenden Aorta. C) RGS5-Genexpression von der thorakalen Aorta (links oben) bis zur *Arteria femoralis* (Verändert nach Zhang *et al.* <sup>108</sup>).

#### 4.4.2 Bedeutung von RGS5 für vaskuläre Remodellierungsprozesse

Genauere Untersuchungen der Expression von RGS-Proteinen, insbesondere von RGS5, weisen auf eine Assoziation mit GMZ hin. Zunächst wurde dies durch *in vitro*-Untersuchungen belegt. Daraufhin wurde die Funktion von RGS5 im Blutgefäßsystem *in vivo* genauer untersucht.

**In vitro-Untersuchungen:** Zhou *et al.*<sup>109</sup> fanden in *in vitro* Untersuchungen in AT1a-293T HEK Zellen, die den AT<sub>1</sub>-Rezeptor konstant bilden, eine durch RGS5 inhibierte Ang II- und ET-1-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung in den Zellen, obgleich es sich hier nicht um GMZ handelt. Gleichzeitig konnten die Autoren zeigen, dass RGS5 durch sein N-terminales Cystein ein Zielprotein des NO-bedingten *N-end rule*-Abbausignalwegs ist, dieser N-Terminus allerdings die RGS5-Aktivität nicht beeinflusst.

Wang *et al.*<sup>110</sup> wiederum transfizierten GMZ aus der Ratten-Aorta *in vitro* mit RGS5-spezifischen Ribozymen. Daraus resultierte eine Inaktivierung von RGS5 bereits auf mRNA-Ebene. Die Inaktivierung von RGS5 führte zu einer verstärkten Ang II-bedingten Inositol-Phosphat-Freisetzung und Phosphorylierung der ERK-Untereinheit ERK2, und leitete eine RGS5-spezifische Enthemmung des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-gebundenen Gα<sub>q/11</sub>-Signalwegs ein.

Moroi *et al.*<sup>111</sup> konnten ferner in 293T HEK Zellen eine Phosphorylierung von RGS5 am Serin 166 durch die am Gα<sub>q/11</sub>-Signalweg elementar beteiligte PKC zeigen. Diese Phosphorylierung durch PKC, die RGS5 transient exprimierten, verringerte die Bindungsstärke von RGS5 und dessen GAP-Funktion gegenüber der Gα-Untereinheit. Durch die Behandlung der Zellen mit ET-1 konnte die Phosphorylierung verstärkt werden und durch PKC-Hemmer wie H7, Calphostin C und Staurosporin gehemmt werden. Mit diesen *in vitro*-Befunden zu RGS5 und den mit dem kardiovaskulären System assoziierten GPCRs wurde der Grundstein für die *in vivo*-Untersuchung des Einflusses von RGS5 im kardiovaskulären System gelegt.

**In vivo-Untersuchungen:** Cho *et al.*<sup>103</sup> untersuchten eine genetisch modifizierte Maus (*rgs5*<sup>lacZ/lacZ</sup>), deren Exon 1 und Intron 1 des *Rgs5*-Gens durch eine lacZ-Kassette ersetzt war. Die Mäuse auf einem gemischten 129Sv/Ev und C57BL/6 Hintergrund zeigten keine Auffälligkeiten in der Entwicklung oder Funktion des kardiovaskulären Systems. Allerdings konnte in den *rgs5*<sup>lacZ/lacZ</sup>-Tieren ein dauerhaft niedriger Blutdruck festgestellt werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Aorten der *rgs5*<sup>lacZ/lacZ</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen dilatiert waren. Eine Veränderung in der Gefäßwanddicke konnte nicht festgestellt werden. Isolierte GMZ der Mutanten zeigten eine übermäßige Phosphorylierung von ERK1/2 nach Aktivierung von GPCRs durch S1P und dem NO-Donor Natriumnitroprussid. Die Autoren schließen aus diesen Beobachtungen auf das Aufrechterhalten des Gleichgewichts im Gefäßtonus durch eine Dämpfung der zur Vasodilatation führenden Signalkaskaden durch RGS5. Damit grenzen sie die Funktion von RGS5 zu RGS2 ab.

Eine weitere Gruppe um Nisancioglu *et al.*<sup>95</sup> generierte eine genetisch modifizierte Maus, deren *rgs5*-Gen von Exon 2 bis Exon 5 durch eine GFP-Sequenz ersetzt wurde (*rgs5*<sup>GFP/GFP</sup>). Mit Hilfe der Tail-Cuff Plethysmographie in wachen, unbetäubten Mäusen zeigten die Autoren einen niedrigeren systolischen und diastolischen Blutdruck in den *rgs5*<sup>GFP/GFP</sup>-Mäusen. Ebenso zeigten die mutierten Mäuse einen niedrigeren mittleren arteriellen Druck (MAD) und eine erhöhte Herzfrequenz, woraus die Autoren auf einen Herzphänotyp schlossen<sup>95</sup>.

Im Kontext von chronischem Bluthochdruck beobachteten Holobotovskyy *et al.*<sup>112</sup> nach Ang II Behandlung eine reduzierte mRNA-Expression von RGS5 in Arterien. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass *rgs5*-Knockout-Mäuse auf dem C3HeBFe-Hintergrund nach Ang II-Behandlung einen signifikanten Anstieg im MAD aufweisen. Im Rahmen eines 1-Clip-2-Nieren-Modells untersuchten die Autoren zudem die Reaktion des murinen Systems auf eine künstlich erzeugte, gesteigerte Salz- und Wasserretention. In diesem Modell gleicht die kontralaterale, nicht festgeklammerte Niere die Salz-

und Wasserretention aus. Die aus diesem Modell resultierende renovaskuläre Hypertonie und der damit verbundene Renin-Angiotensin-Weg wurden im Kontext des nierenbedingten Bluthochdrucks untersucht. Die Autoren konnten mit diesem Modell eine mediale Hypertrophie und Fibrose und eine daraus hervorgehenden Gefäßsteifigkeit in Widerstandsgefäßen der Niere von RGS5-defizienten Mäusen beobachten und folgern daraus eine Verschlimmerung der pathophysiologischen Hypertonie-Eigenschaft bei ausbleibender RGS5-Expression. Zudem geben sie einen PKC und ERK-basierten Signalweg sowie einen ROCK-abhängigen Signalweg als Hauptkaskaden einer RGS5-bedingten Hypertonie an. Daraus resultiert bei einer RGS5-Defizienz in diesen Mäusen eine übersteigerte Antwort auf Ang II.

Im Kontext der Präeklampsie zeigen erneut Holobotovskyy *et al.*<sup>96</sup> eine Beteiligung von RGS5 bei der Blutdruckregulation während der Schwangerschaft. Dabei zeigen sie zum einen, dass die RGS5-Expression in Gefäßen des Myometriums während der Schwangerschaftshypertonie und Präeklampsie unterdrückt wird. Umgekehrt erzeugt eine RGS5-Defizienz in schwangeren RGS5-defizienten Mäusen auf dem C3HeBFe-Hintergrund eine Schwangerschaftshypertonie, indem die Sensitivität der Signalwege der Gefäße für Ang II zunimmt. Gleichzeitig konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)-Agonisten, die antihypertone Effekte haben, im Rahmen der Schwangerschaft ebenfalls durch RGS5 beeinflusst werden.

Im Rahmen der Arteriogenese, dem Wachstum von kollateralen Arteriolen als Kompensation einer fortgeschrittenen Okklusion von großen Leitungsarterien, zeigen Arnold *et al.*<sup>113</sup> *in vivo* einen Anstieg in der RGS5-Menge in GMZ der remodellierenden kollateralen Arteriolen. Ebenso wurde der Einfluss von RGS5 *in vivo* anhand des *rgs5*<sup>GFP/GFP</sup>-Mausmodells untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine RGS5-Defizienz das Kollateralwachstum während der Arteriogenese hemmt. Gleichzeitig konnten die Autoren einen leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg des MAD in den transgenen Mäusen messen. Zudem zeigten Sie, dass in diesen Mäusen ein stark verringerter Blutfluss nach Hinterlaufklatur in den kollateralen Arteriolen vorliegt. Die Dicke der Gefäßwand bei RGS5-defizienten Tieren nahm ebenfalls nicht zu. Gleichzeitig waren die RhoA-Aktivität und die Proliferation der GMZ dieser Tiere gehemmt. Außerdem konnten die Autoren zeigen, dass GMZ der RGS5-defizienten Tiere im Rahmen der Arteriogenese keinen aktivierten Phänotyp erlangen. Vermutlich wird im Rahmen einer anhaltenden  $G\alpha_{q/11}$ -bedingten Signalkaskade in diesen Tieren der ruhende kontraktile Phänotyp der GMZ weitgehend aufrechterhalten. Aus diesen Beobachtungen folgern Arnold *et al.* für RGS5 eine Schlüsselrolle in der Arteriogenese. So könnte es die nachgeschaltete Signaltransduktion von einer  $G\alpha_{q/11}$ -bedingten  $Ca^{2+}$ -abhängigen Kontraktion von GMZ zu einer  $G\alpha_{12/13}$ -bedingten ROCK-abhängigen Aktivierung von GMZ, also zu einem Wechsel in den synthetischen Phänotyp, umsteuern.

Die Gruppe um Daniel *et al.*<sup>114</sup> untersuchte die Effekte von RGS5 *in vitro* und im Rahmen der Neointimabildung nach Federdraht-induzierten Verletzungen der *A. femoralis in vivo* in Mäusen auf

dem C57BL/6 Hintergrund. Dabei beobachteten Sie eine reduzierte mRNA-Expression und Proteinsynthese von RGS5 in neointimalen Verletzungsbereichen 10 und 21 Tage nach Gefäßverletzung. In GMZ aus der Koronararterie zeigten die Autoren *in vitro* eine Herabsetzung der RGS5 mRNA-Expression nach Behandlung der Zellen mit Wachstumsfaktoren. Umgekehrt konnte die RGS5-Expression in GMZ durch adenovirale Vektoren, die für das natürliche RGS5 oder für eine nicht-degradierbare Mutante von RGS5 kodieren, verstärkt werden. Damit konnten sie zeigen, dass die Überexpression von RGS5 einhergeht mit einer limitierten Proliferation und Migration von GMZ *in vitro*. Ebenso führte ein siRNA-basierter *knockdown* von RGS5 zu einer Zunahme der Proliferation der Zellen. In Bezug auf Signalmoleküle, über die RGS5 dabei wirken könnte, fanden die Autoren heraus, dass ERK1/2 und MEK1/2 verantwortlich sind für den antiproliferativen Effekt der RGS5-Überexpression. Gleichzeitig konnten sie mit einer RGS5-Überexpression in den Femoralarterien die aus einer verstärkten Zellproliferation hervorgehende Bildung einer Neointima *in vivo* einschränken. Außerdem konnten sie eine Reduktion von phosphoryliertem ERK1/2 im Vergleich zur Kontrolle feststellen.

#### 4.5 Zielsetzung dieser Doktorarbeit

Die Funktionen von RGS5 im vaskulären System wurden in vorangegangenen Arbeiten in unterschiedlichen Mausmodellen *in vivo* untersucht. Dabei zeigte sich in Mausmodellen vor dem C57BL/6-Hintergrund ein kaum ausschlaggebender Einfluss von RGS5 auf die Gefäßfunktionen in Homoöstate. So zeigten RGS5-defiziente Mäuse keinen Gefäßphänotyp und keine eindeutigen Blutdruckveränderungen<sup>95</sup>. Im Rahmen von Krankheitsmodellen wie z.B. arteriellen Umbauprozessen sowie in kultivierten GMZ, die einen aktivierten Phänotyp besitzen, konnte allerdings eine verstärkte mRNA-Expression und Abundanz des RGS5-Proteins festgestellt werden<sup>113</sup>. Gleichzeitig schien RGS5 diese Umbauprozesse *in vivo* zu beeinflussen; so hemmte RGS5-Defizienz beispielsweise die Arteriogenese<sup>113</sup>, während die übermäßige Präsenz von RGS5 die Neointimabildung hemmte<sup>114</sup>.

Aus diesen Beobachtungen resultierte die dieser Arbeit zugrundeliegende Frage, welchen grundlegenden Einfluss RGS5, abseits von Umbauprozessen als Stimulus, auf den Phänotyp von GMZ hat. *In vitro* Untersuchungen belegten zuvor die Terminierung von  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{i/o}$ -abhängigen Signalwegen durch RGS5. Dies mündete in der Hypothese, dass RGS5 den Phänotyp von GMZ durch die Inhibition der  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{i/o}$ -abhängigen Signalwege in Abhängigkeit des vorliegenden physiologischen bzw. pathophysiologischen Kontextes beeinflusst.

Die daraus abgeleiteten, spezifischen Ziele dieser Arbeit waren

1. Die Analyse des Einflusses von RGS5 (und RGS16 zum Vergleich) auf den Phänotyp von kultivierten GMZ.



2. Die Charakterisierung von Signalwegen, die durch RGS5 beeinflusst werden und welche die beobachteten Veränderungen im Phänotyp der kultivierten GMZ bedingen können.
3. Die Darstellung biomechanisch induzierter Veränderungen im Phänotyp von kultivierten GMZ bei erhöhter RGS5-Abundanz.
4. Die Generierung einer transgenen Maus, mit der in GMZ eine RGS5-Expression induziert werden kann, um die *in vitro* Ergebnisse *in vivo* zu überprüfen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Katalogbezeichnung	Hersteller/Bestellnummer
Gewebezerkleinerungskugeln	<i>Stainless Steel Beads</i> , 5 mm (200)	Qiagen, Hilden / 69989
Normkanüle	Normkanüle 23Gx1“- Nr.16, 0,6 mm x 25 mm	BD Microlance™ 3, Heidelberg/300800
Zellkulturplatten	CELLSTAR® Zellkultur <i>Multiwell</i> Platten / 6, 12, 24 Well Format	Greiner Bio-One, Frickenhausen/657160, 665180, 662160
Zellkulturschalen	60 mm² Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen/93100
Zellkulturplatte mit flexiblem Bodeneinsatz	BioFlex® <i>Culture Plates</i> , Flexcell® Tension System, Collagen Type I	Dunn Labortechnik, Asbach/BF-3001C

##### 5.1.1.1 Kits zur Molekularbiologie und Proteinbiochemie

Bezeichnung	Katalogbezeichnung	Hersteller/Bestellnummer
cAMP Assay	<i>cAMP Parameter Assay Kit</i>	R&D Systems, Minneapolis/KGE002B
cDNA-Synthese	Sensiscript® RT Kit (200)	Qiagen, Hilden/205213
Gene Chip™ Human Gene 2.0 ST Array, Format 100	HUGENE 2.0 ST Array, <i>Gene Chip</i>	Affymetrix, Santa Clara/902112
Lösung zur RNA Stabilisation	RNAlater® <i>RNA Stabilisation Reagent</i>	Qiagen, Hilden/76104
Oligo(dT)15 Primer	Oligo(dT)15 Primer, Endkonzentration 10 µM	Promega, Madison/C110A
Proteome Profiler™	Proteome Profiler™ <i>Human Phospho-Kinase Array Kit</i>	R&D Systems, Minneapolis/ARY003B
<i>Reaction Buffer</i> Set für Taq Polymerasen	<i>Incomplete NH<sub>4</sub> Reaction Buffer</i> (10x), <i>Complete NH<sub>4</sub> Reaction Buffer</i> (10x), MgCl <sub>2</sub> 100 mM	Bioron, Ludwigshafen/102010
RhoA-GTP Assay	RhoA G-LISA® <i>Activation Assay Kit (Colorimetric format)</i>	Cytoskeleton Inc., Denver/BK124-S
RNA-Isolierung	RNeasy® <i>Mini Kit</i> (250), RNeasy® <i>Micro Kit</i> (50)	Qiagen, Hilden/74106, 74004
Taq-Polymerase	Top-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	Bioron, Ludwigshafen/111125
SYBR Green®	LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim/04707516001

## 5.1.1.2 Puffer, Lösungen, Chemikalien – Molekularbiologie

Bezeichnung	Katalogbezeichnung/ Zusammensetzung		Hersteller/Bestellnum mer/ Bemerkungen
Agarose, 1-2 % in TBE	Agarose Basic		AppliChem, Darmstadt/A8963
Blockierlösung für Immunfluoreszenz	50 mM 0,25 % 0,1 % 15 mM Ad 20 ml	Tris-HCl Casein BSA Natriumazid Aqua dest.	erwärmen, um Casein in Lösung zu bringen
Blockierlösung für Western Blot	5 % 3 %	Blotto in 1xTBS-T BSA in 1x TBS-T	-
Casein	Casein from bovine milk		Sigma-Aldrich, Hamburg/C5890
DABCO	Dabco® 33-LV		Sigma-Adrich, Hamburg/290734
Enzypuffer 4	NEBuffer™4		New England Biolabs, Frankfurt am Main/B7004S
Ethidiumbromid	Ethidium bromide ≥98 %		Carl Roth, Karlsruhe/7870.1
Kanamycin	Kanamycin sulfate from Streptomyces kanamyceticus		Sigma Aldrich, Hamburg/K1377
β-Mercaptoethanol	β-Mercaptoethanol, Molecular Biology Grade - CAS 60-24-2 – Calbiochem		Merck, Darmstadt/444203
Ladepuffer nach Laemmli (4x)	62,5 mM 0,005 % 10 % 355 mM 1 %	Tris-HCl pH 6,8 Bromphenol Blue Glycerol β-Mercaptoethanol LDS	-
LB Agar	LB Broth with agar (Lennox)		Sigma Aldrich, Hamburg/L2897
LB-Agarmedium (fest)	15 g 1 l	LB-Agar LB Medium (flüssig)	vorbereitete Platten bei 4°C invertiert lagern
	leicht schütteln, Autoklavieren bei121°C, 20 Minuten. Zum Gießen der Platten auf 60°C kühlen lassen, zügig an Sicherheitsbank mit Antibiotikum versetzen und steril auf Platten gießen, Medium bei Raumtemperatur lagern		
LB Broth	LB Broth (Lennox)Powder microbial growth medium		Sigma Aldrich, Hamburg/L3022
LB-Medium (flüssig)	25 g 1000 ml	LB Broth ultrareines H2O	-

	Leicht schütteln, Autoklavieren bei 121°C, 20 Minuten		
Miglyol ® 812	MIGLYOL® 812, Mittelkettige Triglyceride, CAS: 52622-27-2		Caesar & Loretz GmbH, Hilden/3274
Mowiol	Mowiol 4-88 Reagent		Lagerung bei -20°C, nach Auftauen Lagerung bei 4°C, Merck, Darmstadt/475904;
	2,4 g	Mowiol	
	6 ml	H <sub>2</sub> O	
	6 g	Glyzerin	
	2 Stunden rühren		
	12 ml	Tris (0,2 M) pH 8,5	
	Bei 53°C rühren bis vollständig gelöst, zentrifugieren 5000 rpm für 20 Min. 2,5 % DABCO		
NaCl	0,9 % isotone Natriumchlorid-Lösung zur intravenösen Injektion		B Braun, Melsungen
Neubauer Zählkammer	0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm²		Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen/0640710
Reaktionsansatz: BAC-Plasmid Restriktionsverdau	37 µl 4,5 µl  0,45 µl 3 µl <b>44,95 µl</b>	BAC-DNA 10x Enzympuffer (NEBuffer 4) BSA Enzym (5 - 10 U) <b>Gesamtvolumen</b>	-
Reaktionsansatz: cDNA-Synthese	X Y 2 µl 2 µl 1 µl 1 µl <b>20 µl</b>	RNA (50-250 ng) H2O (RNase-frei) 10x Reaktionspuffer dNTP-Mix (5 mM) Oligo(dT) Primer (10 µM) Reverse Transkriptase <b>Gesamtvolumen</b>	-
Reaktionsansatz: Plasmid-Linearisierung	10 µL 5 µL  3 µL 7 µL <b>25 µL</b>	BAC-DNA (~100 ng/µl) Enzympuffer (NEB-Puffer 3.1) Enzym (NotI) H2O <b>Gesamtvolumen</b>	-
Reaktionsansatz: quantitative Echtzeit-PCR	10 µL 1 µL 1 µL 8 µL <b>20 µL</b>	SYBR Green I Primer fwd. (10 µM) Primer rev. (10 µM) cDNA (1-5 ng/µl) <b>Gesamtvolumen</b>	-
Reaktionsansatz: SM-MHC/Cre Standard-PCR	17 µl 2,5 µl 0,5 µl 0,2 µl 1 µl 1 µl	H2O 10 x Reaktionspuffer MgCl2 dNTP (10 nM) Primer 1 Primer 2	-

	1 µl 0,1 µl 1 µl <b>24,3 µl</b>	Primer 3 Taq-Polymerase DNA <b>Gesamtvolumen</b>	
Tamoxifen	1 mg/kg pro Tag in Miglyol® 812		Sigma-Aldrich, Hamburg/5648
Triton X-100	Triton® X-100 <i>for analysis</i> . CAS 9036-19-5		Merck, Darmstadt/1.08603

#### 5.1.1.3 Puffer, Lösungen und Chemikalien – Proteinbiochemie

Bezeichnung	Katalogbezeichnung/ Zusammensetzung		Hersteller/ Bestellnummer/ Bemerkungen
1× PBST	1× 0,05 %	PBS Tween-20	-
1× TBST	1× 0,05 %	TBS Tween-20	-
10× PBS	160 g 4 g 23 g 4 g Ad 2 l	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Aqua dest.	-
15 % Trenngel	2,2 ml 5,0 ml 2,6 ml 100 µl 100 µl 10 µl	H <sub>2</sub> O 30 % Acrylamid 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 10 % SDS 10 % APS TEMED	-
5 % Sammelgel	5,86 ml 1,34 ml 2,6 ml 100 µl 100 µl 10 µl	H <sub>2</sub> O 30 % Acrylamid 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 10 % SDS 10 % APS TEMED	-
10× SDS-PAGE Laufpuffer	30,2 g 188 g 50 ml Ad 1 l	Tris Glyzin SDS (20 %) Aqua dest.	-
10× TBE	90 mM 73 mM 3 mM	Tris-HCl pH 7,5 Borsäure EDTA	-
10× TBS	122 g Tris 175 g Ad 2 l	Tris-HCl pH 7,6 NaCl Aqua dest.	-
Acrylamid	Rotiophorese® Gel 30 (37,5:1)		Roth, Karlsruhe/3029.1

Agarose	Agarose, BioReagent, for molecular biology, low EEO		Sigma-Aldrich, Hamburg/A9539
BSA	Albumin from bovine serum		Lagerung bei 4°C Sigma-Aldrich, Hamburg/A2153
DNA-Probenpuffer	DNA Gel Loading Dye (6X)		Fermentas, St. Leon-Rot/R0611
DNA-Standard	O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus ready-to-use		Thermo Fisher, Scientific/SM1153
ECL-Reagenz	Luminata™ Forte Western HRP Substrate		Merck Millipore, Darmstadt/WBLUF0500
Einfriermedium	10 %	DMSO in FKS	-
Ethanolamin	Ethanolamine, puriss. p.a., ACS reagent, ≥99.0 % (GC/NT)		Sigma-Aldrich, Hamburg/02400
Injektionspuffer	10 mM 100 mM 0,1 mM	Tris-HCl pH 7,5 NaCl EDTA	steril filtrieren
Kollagenlösung	1,25 g Kollagenfasern in 250 ml 0,1%iger Essigsäure		-
Lysepuffer für Schwanzbiopsien	100 mM 0,1 % 5 mM 200 mM Ad 100 ml	Tris-HCl pH 8,5 SDS EDTA NaCl Aqua dest.	-
Blockierlösung, Western blot	Blotto, non-fat dry milk		Santa Cruz, Heidelberg/sc-2325
Ponceau S Färbelösung	Ponceau S Solution		Sigma Aldrich, Hamburg/P7170
Protease und Phosphatase Inhibitormix	HALT™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (100x)		Thermo Fisher Scientific, Darmstadt/78442
P1-Puffer	50 mM 10 mM	Tris-HCl pH 8,0 EDTA	-
	RNase A (0,1 mg/ml) kurz vor Gebrauch dazu		
P2-Puffer	0,2 M 1 %	NaOH SDS	-
P3-Puffer	3 M	Kaliumacetat pH 5,5	pH-Wert mit Essigsäure einstellen
Proteinstandard SDS-PAGE	Precision Plus Protein™ Dual Color Standard		BioRad, München/161-0374
PVDF-Membran	Immobilon-FL PVDF, 0,45 µm		Merck, Darmstadt/IPFL00010
RIPA-Proteinlysepuffer	790 mg 900 mg 75 ml 10 %	Tris pH 7,4 NaCl H2O NP-40	-

	1 ml 10 mM Ad 100 ml	10 % Natriumdesoxycholat EDTA Aqua dest.	
Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-HCl pH 6,8	-
Stripping Puffer	Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer		Thermo Fisher Scientific, Darmstadt/46430
SYBR® Green	LightCycler® 480 SYBR Green I Master		Roche, Mannheim/0470751 6001
TEMED	TEMED, ≥99 %, p.a., für die Elektrophorese		Carl Roth, Karlsruhe/2367.3
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8	-
Tween® 20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat, Polysorbat 20		Carl Roth, Karlsruhe/9127.1
Western Blot Transferpuffer	400 ml 25 ml 6 ml	Methanol p.a. 2 M Glyzin Ethanolamin	-

#### 5.1.1.4 Puffer, Lösungen und Chemikalien – Zellkultur

Bezeichnung	Katalogbezeichnung/ Bemerkungen	Hersteller/Bestellnummer
Antibiotika	Pen Strep, Penicillin 5000 U/ml, Streptomycin 5000 µg/ml	Gibco® Life Technologies, Darmstadt/15070063
Antimykotikum	<i>Fungizone</i> , 250 µg/ml	Invitrogen™ Life Technologies, Darmstadt/15290-018
Dimethylsulfoxid	Dimethylsulfoxid für die Zellkultur	AppliChem, Darmstadt/A3672
fetales Kälberserum, FKS	FBS, Origin: EU-approved countries (South America)	Dimethylsulfoxid für die Zellkultur/S 0115
Luftgemisch	CRYSTAL Gemisch (Kohlendioxid 5 %, Synthetische Luft 95 %, 10 L, 1,550 cbm. (1 bar, 15°C))	Spezialgasewerk, Air Liquide, Krefeld
Methylzellulose	<i>Methyl cellulose viscosity</i> : 4,000 cP	Sigma Aldrich, Hamburg/M0512
M199 (10x)	Medium 199, 10 ×, <i>With Earle's salts, without L-glutamine and sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture</i>	Sigma Aldrich, Hamburg/M0650
Nährmedium, serumfrei	Panserin 401, Pan™	Biotech, Aidenbach/P04-710401
Nährmedium, serumhaltig	Gibco® DMEM (+ glutaMAX-I, + 1 g/L <i>Glucose</i> , + <i>Pyruvat</i> )	Life Technologies, Darmstadt/21885-025
TAT-Cre Recombinase	10.000 U/ml	Merck, Darmstadt/SCR508
Trypsin	Gibco® 0,05 % Trypsin-EDTA(1×)	Life Technologies, Darmstadt/25300-054
Waschmedium, +CaCl <sub>2</sub> /+MgCl <sub>2</sub> , HBSS +/-	<i>HBSS, no calcium, no magnesium, no phenol red</i>	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt/14175-053

Waschmedium, +CaCl <sub>2</sub> /+MgCl <sub>2</sub> , DPBS +/-	DPBS, <i>Calcium, Magnesium</i>	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt/14040-174
Waschmedium, ohne CaCl <sub>2</sub> /MgCl <sub>2</sub> , DPBS -/-	DPBS, <i>no Calcium, no Magnesium</i>	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt/14190-094

### 5.1.2 Geräte

Bezeichnung	Katalogbezeichnung	Hersteller/Bestellnummer
Bakterieninkubator	Innova 4230	New Brunswick Scientific, Eppendorf, Hamburg / -
Chemilumineszenzdetektor	ImageQuant LAS 4000 Mini	GE Healthcare, München / 28- 9558-13
FlexCell™ FX-5000 Tension System	1.0v, Dunn Labortechnik	Asbach /-
Gel Dokumentationssystem	Gel Doc™ Xr+ <i>Gel Documentation System</i>	Bio-Rad, München /-
Gewebezerkleinerer	<i>Tissuelyser</i>	Qiagen Retsch®, Hilden /-
Inkubatoren	Innova CO-170, <i>Function Line</i>	New Brunswick Scientific, Eppendorf, Hamburg / -
Kontrollbox	IX3-CBH	Olympus, Hamburg /-
Kontrollbox für schnellen Filterwechsel und Schließer	U-CBF	Olympus, Hamburg /-
Mikroskope	Binokular	Leica Biosystems, Wetzlar / GZ6
	Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg / IX83
	Konfokalmikroskop	Olympus, Hamburg / IX81
	Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg / CKX41
	OP-Mikroskop	Wild Heerbrugg, Gais/ M650
	Stereomikroskop	Wild Heerbrugg, Gais/ M5- 51845
Mikrotiterplatten-Fluorometer	Fluoroskan Ascent mit einem Dispenser	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig / 5210480
Mikrotiterplatten-Lesegerät	<i>Power Wave XS</i>	Bio-Tek, Bad Friedrichshall / -
Netzteil	<i>PowerPacHC</i> , 250 V, 3 A, 300 W	Bio-Rad, München /-
PCR-Maschinen	<u>Quantitative Echtzeit-PCR:</u> Rotor-Gene Q	Qiagen, Hilden / -
	<u>Standard-PCR:</u> Pqclab Primus 96	Peqlab, Erlangen / -
Photospektrometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig / -



Schrittmotorsteuerung	Tango Desktop	Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar / -
SDS-PAGE Apparatur	Mini-Protean® <i>Tetra Cell</i>	Bio-Rad, München / 165-8037EDU
Sicherheitswerkbank	<i>DNA/RNA UV-Cleaner UVT-S-AR</i>	Biosan, Riga
	<i>UV-cabinet for PCR operations, UVT-B-AR</i>	Grantbio, Cambridgeshire
	HeraSafe	Heraeus Instruments, Thermo Scientific, Braunschweig
	Kojair Tech OY - KR Biowizard <i>Silver Line Safety Cabinet</i>	Kojair Tech Oy, Vilppula/ KR-130 BW
Silikonbarrieren	flexiPerm	Greiner Bio-One, Frickenhausen / 90032039
Software	AnalySIS <i>Image Processing 5.0v</i>	Olympus, Hamburg / -
	<i>Ascent Software 2.6v</i>	Thermo Labsystems Oy, Vantaa/ -
	<i>CellSens Dimension 1.12v</i>	Olympus, Hamburg / -
	ImageJ 1.49v	Wayne Rasband National Institute of Health, Maryland/ -
	KCjunior 1.41.8v	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall / -
	Quantity One 4.6.9v	BioRad, München / -
	<i>Rotor-Gene Q Pure Detection System Version 2.1.0 (Build 9)</i>	Qiagen, Hilden / -
Stage Top Inkubator	<i>Tokai Hit, INU Incubation System for Microscope Stages</i>	Tokai Hit Co., Ltd., Shizuoka/ -
Zentrifugen	Heraeus <i>PICO 21 Centrifuge, Z 323K</i>	Thermo Scientific, Braunschweig / -
	MIKRO 22 R und Universal 32	Hettich, Zentrifugen, Tuttlingen / -
	<i>Megafuge 1.0</i>	Heraeus Instruments M&S, Laborgeräte, Wiesloch / -
	Hermle, Universalzentrifuge	Hermle Labortechnik, Wehingen/ -

### 5.1.3 Zellen

Die Nutzung humaner Nabelschnüre zur Isolierung arterieller GMZ erfolgte mit Genehmigung des lokalen (Heidelberg) Ethikkomitees (Aktenzeichen 336/2005) unter Beachtung der Deklaration von Helsinki (1997). Nabelschnüre wurden von umliegenden Krankenhäusern bereitgestellt. Ebenso wurden humane GMZ aus der Aorta und aus der Nabelschnur kommerziell bezogen.

Bezeichnung	Herkunft
Primäre humane arterielle glatte Gefäßmuskelzellen (HUASMCs)	Nabelschnurarterie, Mensch

Primäre murine arterielle glatte Gefäßmuskelzellen (MAoSMCs)	Aorta, Maus (C57BL/6)
Human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs)	Aorta, Mensch, Promocell GmbH, Heidelberg Bestellnummer: C-12533/C-12532
Human umbilical arterial smooth muscle cells (HUASMCs) (cryopreserved)	Nabelschnurarterie, Mensch, Provitro AG, Berlin, Bestellnummer: 1210611/1110611; Lot No. 010W250400

#### 5.1.4 Viren

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer / eingesetzte Verdünnung bzw. Konzentration
Polybrene Infektions-/Transfektionsreagenz	Sigma Aldrich, Hamburg	TR-1003-G / 2 µg/ml
Adenovirus rAVCMVLifeAct-TagRFP	ibidi®, Planegg/Martinsried	60121 / Stock 1*10 <sup>7</sup> IU/µl, MOI100: 0,75 µl bei 70000 Zellen/6-well (1 well)
Adenovirus GFP	Prof. Dr. Wieland, Experimentelle Pharmakologie, Mannheim	Stock verdünnen 1:7.500 bei 70.000 Zellen/6-well (1 well)
Adenovirus RGS5		
Adenovirus RGS16		

#### 5.1.5 DNA und RNA

##### 5.1.5.1 Sequenz BAC-Konstrukt

Farbkodierung	BAC-Konstrukt (Transgene Maus)
<u>Grau</u> : BAC-Vektorüberhänge <u>Schwarz</u> : SM-MHC-Myh11-Promotor-Sequenz <u>Gelb</u> : LoxStopLox-Sequenz <u>Grün</u> : Kozak Fragment <u>Rot</u> : murine RGS5-kodierende Sequenz <u>Blau</u> : bGH poly(A)-signal termination Sequenz	gtgagggcctactgtctctaggtttgttctgacccatctctcactccacaggggaccaccagacatc ataacttcgtatagcatatacgaagtattgtttattgcagcttataatggttacaaataaagca atagcatcacaatttcacaaataaagcattttttcactgcattgtttattgcagcttataatggttac aataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcattttttcactgcattgtttattgcagcttata atggttacaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcattttttcactgcataaactcg tatagcatatacgaagttagccgccacatgtgtaaggagctggcagctctgccgactcatg cctggaaaggccaaggagatcaagatcaagttgggaattctctccagaagccagactctgtgtg acctgtcattccatacaatgagaagccagagaagcctgccaaggcacacaagccctactggagga ggctcctgcagtggcgccagtcctggacaagcttctccagaacagctatggatttgccagcttcaaaag tttctgaagtctgaattcagttaggaaaaccttgagttctgggttgctgtgagaattacaagaagatc aagtcccccataaaaatggcggagaaggcaaaagcaatttatgaagaattcatccagacagaggccc ctaaagaggtgaacattgaccattcactaaagacatcaccatgaagaacctggtggaacctctcct cgagcttgacttggccagaaaaggatctatgccctgatggagaaggattctctgccccgcttgtgc gctctgaattttataaggagctaataagtagctgtgccttctagtggccagcatctgtgtttgccctc ccccgtgccttccttgacctggaaggtgccactccactgtcctttcctaataaaataggaaattgca tcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggagga ttgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatgggccaccaggtacctgtgcctc cagctttacagctcgtgtgtcacactgtcccttatatctc

## 5.1.5.2 Primersequenzen

Bezeichnung		Sequenz	Annealing-Temperatur
1	(human) RPL32	5'-AGGCATTGACAACAGGGTTC-3' 5'-GTTGCACATCAGCAGCACTT-3'	56°C
2	(human) RGS5	5'-GGTGGAACCTTCCCTGAGCAGC-3' 5'-AGAGCGCACAAAGCGAGGCA-3'	60°C
3	(murin) SM-MHC-RGS5 Geno3 <i>reverse</i>	5'-CTACTTGATTAGCTCCTTATAAAA-3'	61°C
4	(murin) SM-MHC-RGS5 Geno8 <i>forward</i>	5'-GGTGAGGGCCTACTTGTCTCT-3'	61°C
5	(murin) SM-MHC-RGS5 Geno9 <i>reverse</i>	5'-CTGGGTACAGAGATATAAGGG-3'	61°C
6	SMWT1	5'-TGACCCCATCTCTTCACTCC-3'	58°C
7	SMWT2	5'-AACTCCACGACCACCTCATC-3'	58°C
8	phCREAS1	5'-AGTCCCTCACATCCTCAGGTT-3'	58°C

## 5.1.6 Antikörper und Farbstoffe

## 5.1.6.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Hase anti-human ERK1/2	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt am Main	#4695S	1:1000
Hase anti-human pERK1/2		#4370S	1:2000
Maus anti-human VCP	Abcam, Cambridge	ab11433	1:3000
Hase anti-human Ki-67		ab16667	1:100
Maus anti-beta-Aktin (modifiziert aus Keyhole Limpet Haemocyanin)		ab6276	1:5000
Hase anti-human Calponin		ab46794	1:2000
Huhn anti-human RGS5	Sigma-Aldrich, Hamburg	GW22900	1:400
Maus anti-human RhoA	Santa Cruz, Heidelberg	sc-418	1:1000
Maus anti-recombinante His-Probe H3		sc-8036	1:1000
Maus anti-human Myosin, smooth Muscle	eBioscience/Thermo Fisher Scientific	14-6400-80	1:1000

## 5.1.6.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Ziege anti-Huhn IgY (Gesamtmolekül), Cy3	Dianova, Hamburg	103-165-155	1:100
Esel anti-Hase IgG (F(ab)2 Fragment), Cy3		711-166-152	1:100
Ziege anti-Hase IgG (Gesamtmolekül), Peroxidase Antikörper	Sigma-Aldrich, Hamburg	A6154	1:2500
Ziege anti-Maus IgG (Gesamtmolekül), Peroxidase Antikörper		A4416	1:2500 (1:10.000 bei $\beta$ -actin)

## 5.1.6.3 Konjugierte Reagenzien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
DAPI	Invitrogen™ Life Technologies, Darmstadt	D1306	1:2500 (2 $\mu$ g/ml)
DNaseI	Desoxyribonuklease I Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen™, Molecular Probes®, Oregon	D12371	1:500 (10 $\mu$ g/ml)
Phalloidin (Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor 546®)	Invitrogen™, Molecular Probes, Oregon	A12379	1:40 (5 U/ml)

## 5.1.7 Stimulatoren und Inhibitoren

Bezeichnung	Endkonzentration/Menge	Hersteller / Bestellnummer
Angiotensin II	1 $\mu$ M	Sigma-Aldrich, Hamburg A6402
Bradykinin	0,01 $\mu$ M	Sigma-Aldrich, Hamburg B3259
C3-Transferase (Rho Inhibitor I)	5 $\mu$ g/ml	Cytoskeleton Inc., # CT04-B
Forskolin	25 $\mu$ M	Sigma-Aldrich, Hamburg F6886
Kollagenase	0,05 %	Sigma-Aldrich, Hamburg C0130
Palbociclib (PD0332991)	0,1 $\mu$ M	Selleckchem, München S1116
Pertussistoxin	200 ng/ml	Tocris, WiesbadenNordenstadt 3097
Pluronic® F-127	0,02 %	AAT Bioquest, California 20050
Quest Rhod-4™	2,5 ng/ $\mu$ l	AAT Bioquest, California AM 21121
Sphingosin-1-Phosphat	10 $\mu$ M	Sigma-Aldrich, Hamburg S9666

YM-254890	2 µM	WAKO Chemicals, Neuss 257-00631
-----------	------	---------------------------------

### 5.1.8 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Schnittstelle	Hersteller/Bestellnummer
Not I (10.000 U/ml)	98944-90209; 90210-98943	New England Biolabs, Frankfurt am Main/ R0589S, R0189S, R0157S
SacII (20.000 U/ml)	3184-50240; 50240-90166; 90166-4; 4-3184	

### 5.1.9 Präparationsbesteck

Bezeichnung	Hersteller	Katalogbezeichnung	Bestellnummer
Federschere	Fine Science Tools Heidelberg	Spring scissor with especially fine, small blade, 8 cm	15000-00
lange Schere		Fino Straight, Metzenbaum	14518-18
feine Pinzetten		Dumont #5/45, Dumoxel Standard Tip Tissue Forceps Graefe Forceps Dumont #3c Dumont #5, Dumoxel	11251-35, 11021-14, 11052-10, 11231-20, 11252-30
grobe Pinzetten	WPI	Adson Forceps, 12 cm with 1x2 teeth serrated jaws	14226-G, 500092 , 500222-G
Knopfkanüle	Acufirm, Dreieich	-	KRA1464L1B

### 5.1.10 Mauslinien

Mauslinie	Herkunft	Genetische Veränderung
C57BL/6N (WT)	Charles River Laboratories, Sulzfeld	keine (Wildtyp)
<i>rgs5</i> <sup>GFP/GFP</sup> (RGS5 <sup>-/-</sup> )	Dr. Christer Betsholtz, Karolinska Institut, Stockholm Schweden	Austausch des RGS5 Exon 2-5 durch GFP  (Nisancioglu <i>et al</i> , 2008b)
SM-MHC-CreER <sup>T2</sup>	Prof. Stefan Offermanns, MPI für Herz-und Lungenforschung, Bad Nauheim	CreER <sup>T2</sup> Expression unter der Kontrolle des Maus Myh11 Promotors auf dem BAC Transgen (Wirth <i>et al</i> , 2008)
CreERT-SMMHC-LSL-RGS5	Prof. Thomas Korff, Herz- und Kreislaufphysiologie, Heidelberg	Durch Tamoxifen induzierbare, verstärkte RGS5-Expression unter Kontrolle des Maus Myh11 Promotors auf BAC Transgen (laboreigen)

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 (S1- und S2-) Zellkulturtechniken

#### 5.2.1.1 Isolierung glatter Gefäßmuskelzellen aus der Nabelschnur

Zur Gewinnung humaner arterieller glatter Gefäßmuskelzellen (HUASMC) aus der Nabelschnur wurde an einer Sicherheitswerkbank gearbeitet. Um beschädigte Gewebeabschnitte zu entfernen, wurden in einem initialen Schritt die Enden der jeweils vorliegenden Nabelschnur um 1-2 cm gekürzt. Anschließend wurden beide Arterien von der Amnionmembran und der Wharton-Sulze befreit. Die nun freiliegenden Gefäße wurden im nächsten Schritt auf Knopfkanülen aufgezogen und mit HBSS blutleer gespült. Um die Endothelzellen zu entfernen, wurde die Arterie auf der Knopfkanüle mehrmals vor- und zurückgezogen und gespült. Die Arterien wurden dann in einer runden Zellkulturschale (100 mm<sup>2</sup>) in 3x3 mm breite Quadrate geschnitten und auf den Schalenboden gelegt. Zur besseren Haftung der Quadrate an den Schalenboden wurde die Schale bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden vorsichtig 13 ml Zellkulturmedium (DMEM, 1,0 g/L Glucose mit 15% FBS, Antibiotika und Antimykotikum) hinzugegeben. In den ersten zehn Tagen erfolgte einmal ein Mediumwechsel, bis erste GMZ um die Arterienquadrate ausgewachsen waren. Sobald die Zellkonfluenz der ausgewachsenen Zellen 70 % des Plattenbodens bedeckte, wurden die Quadrate aus der Schale entfernt. Die GMZ wurden mit HBSS Waschmedium gewaschen, durch Trypsin/EDTA vom Schalenboden gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation (1000 x g, 5 Minuten) sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in frischem vorgewärmten Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) transferiert.

#### 5.2.1.2 Isolierung glatter Gefäßmuskelzellen aus der Mauseorta

Nach Tötung des Tieres durch CO<sub>2</sub>-Narkose und zervikaler Dislokation wurde die *Aorta descendes* bis zum Ende der *Aorta abdominalis* zunächst noch im Tierkörper von der Adventitia freipräpariert. Hierfür wurde die Aorta von ihren dorsalen Abgängen mithilfe einer Federschere abgetrennt. Im abdominalen Bereich wurde an einer Schnittkante mit feinen Pinzetten die *Tunica adventitia* gefasst und in kurzen Abschnitten nach oben gestreift. Sobald die glatte Muskelschicht der abgehenden thorakalen Aorta frei präpariert war, wurde die Aorta am thorakalen und abdominalen Ende mit einer Federschere vom Tier getrennt und in eine Zellkulturschale (35 mm<sup>2</sup>) überführt. Anschließend wurde sie mit HBSS mittels Normkanüle (23Gx1“, BD Microlance™ 3) blutleergespült. Zum Entfernen der Endothelschicht wurde die Aorta zudem mehrmals auf einer Kanüle auf- und abgezogen. Die Aorta wurde dann in kleine Ringe geschnitten und in einer 6-Loch-Zellkulturplatte (eine Aorta pro 6-Loch-Vertiefung) auf der Schnittseite

aufgestellt. Nach 5 Minuten wurde den Ringen Nährmedium mit Antibiotika und Antimykotikum und Kollagenase (0,05 % Endkonzentration) vorsichtig hinzugefügt. Die Segmente wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> verdaut, am nächsten Morgen an einer Sicherheitswerkbank mit dem kollagenasehaltigen Medium abgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation (5 Min., 1000 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Nachdem die Zellen in vorgewärmtes frisches Nährmedium mit Antibiotika und Antimykotikum aufgenommen wurden, wurden die Ringe erneut in eine Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte gegeben und mehrfach mit einer 1000 µl-Pipette auf- und abpipettiert. Anschließend inkubierten die Ringe so lange, bis erste Zellen ausgewachsen sind. Nach einer Zelldichte von ca. 15-20 % pro 9,5 cm<sup>2</sup>, wurden die Ringe mit einer feinen Pinzette aus der Loch-Vertiefung entfernt und frisches Nährmedium hinzugegeben, das drei Tagen gewechselt wurde. Nachdem eine Zelldichte von 70 % pro 9,5 cm<sup>2</sup> erreicht wurde, wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche (25 mm<sup>2</sup>) passagiert und von da an in Nährmedium ohne Antibiotikum und Antimykotikum kultiviert.

#### 5.2.1.3 Kultivierung und Zellpassage glatter Gefäßmuskelzellen

Primäre HUASMCs wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) versetzt mit Serum (FKS, 15 %) kultiviert. Auf den Zusatz von Antibiotika und Antimykotikum wurde verzichtet, sobald die Zellen das erste Mal passagiert wurden. Frisches Nährmedium erhielten die Zellen alle zwei bis drei Tage.

Die Zellen wurden ab Erreichen einer Zelldichte von 8500 Zellen/cm<sup>2</sup> passagiert. Hierfür wurden sie mit 10 ml vorgewärmtem DPBS +/- gewaschen und für 2 Minuten mit 2,5 ml Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, die Trypsin-Aktivität durch die Zugabe von 10 ml vorgewärmtem, serumhaltigen Nährmedium abgestoppt und die abgelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zentrifugation (5 Minuten, 1000 x g) wurden sie sedimentiert, anschließend in 9 ml frischem Nährmedium resuspendiert und jeweils eins zu drei in eine neue Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) überführt. Das Nährmedium in der Flasche wurde auf 12 ml aufgefüllt. Primäre HUASMCs wurden höchstens achtmal passagiert, während primäre murine arterielle GMZ aus der Aorta (MAoSMC) höchstens fünfmal passagiert wurden.

Für nachfolgende Versuche wurden pro 6-Loch-Zellkulturplatte 50.000 Zellen pro Vertiefung und abhängig von den experimentellen Bedingungen des nachfolgenden Versuchs bis zu einer (max.) 80%igen Zellkonfluenz kultiviert.

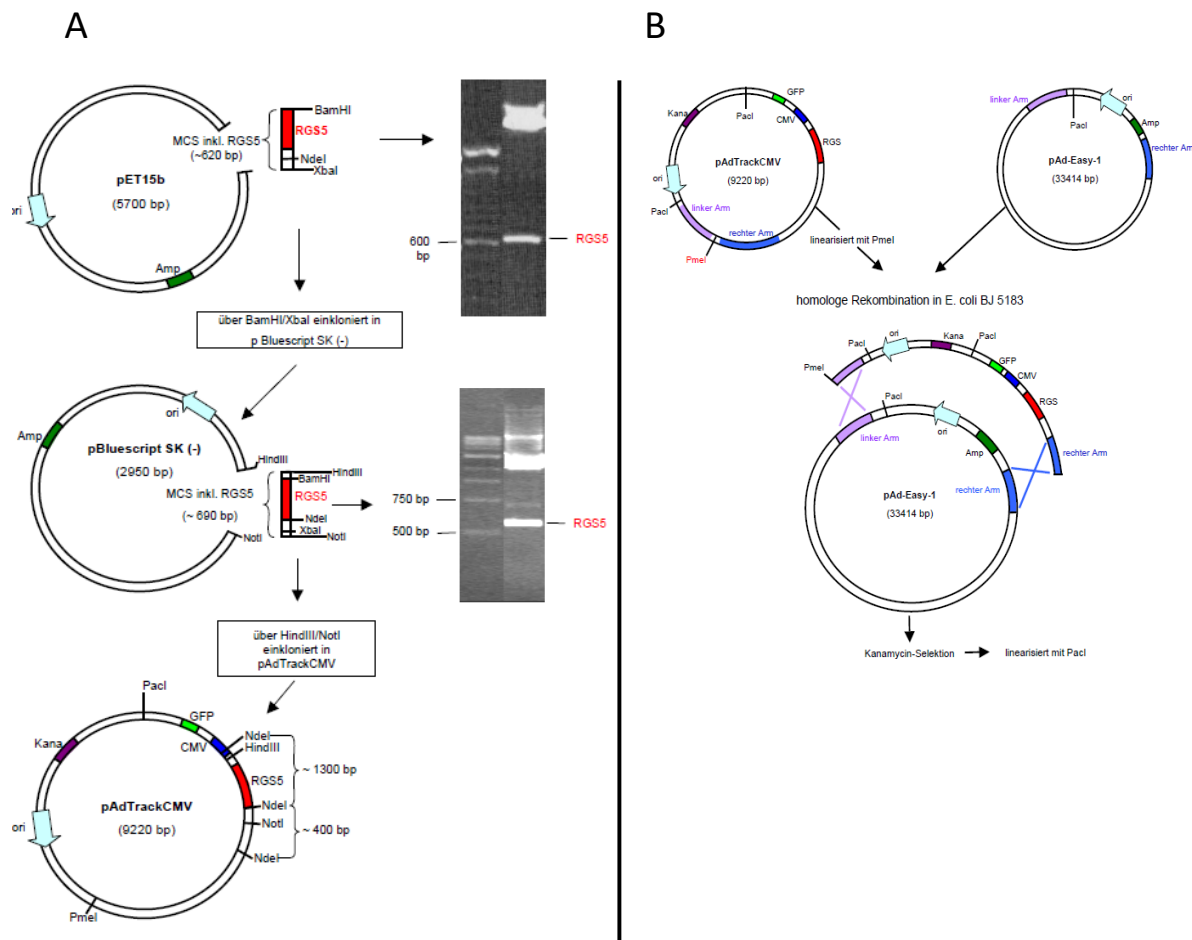
#### 5.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um gewonnene HUASMCs zu konservieren, wurden diese entsprechend dem Passagivorgang trypsiniert, mittels Zentrifugation sedimentiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt. Dieses wurde dann in einem Einfrierbehälter über Nacht bei -80°C gelagert und anschließend zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert. Um die Zellsuspension zur Benutzung wieder aufzutauen, wurde das Röhrchen dann in einem aufgewärmten Wasserbad (37°C) aufgetaut, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem, serumhaltigem Nährmedium aufgenommen und bei 1000 x g 5 Minuten sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 12 ml serumhaltigem Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (75 mm<sup>2</sup>) überführt.

#### 5.2.1.5 Adenovirus-Vektor-basierte Transduktion von Gefäßmuskelzellen

Die in dieser Arbeit genutzten Adenoviren, die einen für GFP, RGS5 und RGS16 kodierenden Vektor enthalten, wurden von Prof. Thomas Wieland (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mannheim) bereitgestellt. Die Virenerstellung erfolgte nach dem von Bert Vogelstein<sup>115</sup> veröffentlichten Protokoll in Anlehnung an das AdEasy System (Abbildung 8).





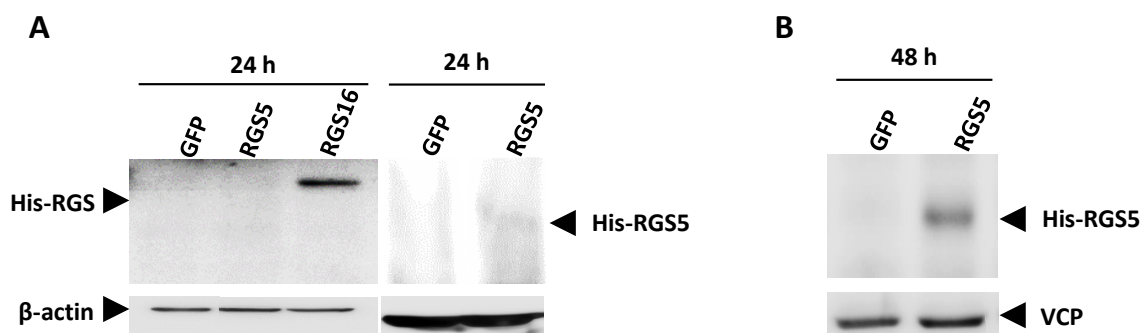
**Abbildung 8 Vektorkarte des zur Überexpression von GFP oder humanem RGS-Protein verwendeten pAdTrack-CMV. (A)** zeigt das Klonierungsschema der Adenoviren nach Bert Vogelstein in den pAdTrackCMV Vektor. Zur Sequenz der humanen RGS-Proteine RGS5 und RGS16 wurde am N-Terminus ein His<sub>6</sub>-Tag hinzugefügt und über die HindIII/NotI Restriktionsschnittstellen in den Vektor kloniert. Unter der Kontrolle eines weiteren CMV-Promotors wird das grün fluoreszierende Protein (GFP) verstärkt exprimiert (He et al, 1998). **(B)** zeigt die homologe Rekombination durch vorangegangene Linearisierung mit Hilfe der Restriktionsendonuklease PmeI der in (A) klonierten pAdTrackCMV-Vektoren, die die entsprechende RGS-Proteinsequenz enthalten. Diese Vektoren wurden mit dem ungeschnittenen pAdEasy-1 versetzt und mit elektrokompenten *E. coli* BJ-5183 gemischt. Die Selektion erfolgte auf Kanamycin-haltigen Agarplatten.

In einem ersten Klonierungsschritt wurden die Sequenzen für RGS5, RGS16 und/oder für das grün fluoreszierende Protein (GFP) in einen pAdTrack-CMV-Vektor eingefügt. Dabei wurden an die humanen RGS5 und RGS16-Sequenzen, deren Expression durch einen Zytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) reguliert wird, jeweils N-terminale His<sub>6</sub>-Tags gekoppelt (s. 5.2.1.6). Hinzu kommt, dass die für RGS5 und RGS16 kodierenden Systeme gleichzeitig auch für GFP kodieren und transduzierte Zellen dieses mit den RGS-Proteinen koexprimieren. Die GFP-Überexpression erfolgt in allen Systemen parallel zur Expression des RGS-Gens, da es von einem zusätzlichen CMV-Promotor reguliert wird. Die daraus entstehende Grünfärbung transduzierter Zellen bestätigt eine erfolgreiche Transduktion und gibt die Transduktionseffizienz durch das jeweilige Virus wieder. Der Kontrollvektor kodiert lediglich für GFP. In einem weiteren Schritt wurde der pAdTrack-CMV-Vektor in das AdEasy System durch homologe Rekombination implementiert.

Die so gewonnenen Viren wurden zur Transduktion der HUASMCs genutzt. Hierfür wurden die Viren direkt aus dem zuvor bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerten Einfrierröhrchen entnommen und erst 1:25 (RGS5), 1:30 (RGS16) und 1:40 (GFP) vorverdünnt. Die Zellen wurden nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 70 % im S2-Labor mit HBSS gewaschen. Anschließend wurde in eine Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte 1 ml vorgewärmtes serumfreies Nährmedium (Panserin 401) mit  $2\text{ }\mu\text{g/ml}$  Polybrene gegeben. Zu diesen 1 ml Panserin wurden entsprechend  $4\text{ }\mu\text{l}$  der Virus-Vorverdünnung hinzugefügt. Zellen wurden in der Virensuspension 4 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Danach wurden sie erneut zweimal mit HBSS gewaschen und erhielten 2 ml pro Vertiefung vorgewärmtes, serumfreies Nährmedium ohne Polybrene für weitere 20 Stunden. Die Versuche starteten 24 Stunden nach Adenovirus-Vektortransduktion mit Ausnahme der Versuche zur Transkriptomanalyse. Die Transduktionseffizienz wurde frühestens 16 Stunden nach Transduktion mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops IX83 auf Basis der GFP-spezifischen Fluoreszenzintensität bestimmt.

#### 5.2.1.6 Nachweis von Adenovirus-Vektor-induzierter RGS5- und RGS16-Überexpression in HUASMCs

Um die RGS5- bzw. RGS16-Synthese nach Transduktion von HUASMCs mit Adenovirus-Vektoren mit dem RGS5- bzw. RGS16-Gen zu überprüfen, wurden Zellen wie bereits beschrieben (s. 5.2.1.5) behandelt. Sowohl RGS5 als auch RGS16 wurden über einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag detektiert, der im Vektor an das jeweilige RGS-Gen folgt (s. Abbildung 8) und mit der Expression des jeweiligen RGS-Gens koexprimiert wird und während der Translation an das RGS-Protein gekoppelt wird. 24 Stunden nach der Behandlung der HUASMCs mit den entsprechenden Adenoviren zeigte sich bei ca. 21 kDa eine schwache Bande, deren Größe dem His<sub>6</sub>-gekoppelten RGS5-Protein entspricht. Eine weitere, deutliche Bande war bereits bei ca. 24 kDa (Abbildung 9 A) erkennbar und entspricht dem His<sub>6</sub>-gekoppelten RGS16-Protein. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden nach Transduktion der Zellen mit dem für



**Abbildung 9 Nachweis von His-RGS5 und His-RGS16 in HUASMCs.** (A) Die Adenovirus-Vektor-induzierte Überexpression von RGS5 und RGS16 wurde mittels Protein-gekoppelter His<sub>6</sub>-Tag Detektion 24 Stunden und (B) für RGS5 zusätzlich nach 48 Stunden nach Transduktion von HUASMCs mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren nachgewiesen (Das Referenzprotein für die Proteinlademenge ist bei (A) β-Aktin, bei (B) VCP; die Proteingröße von His<sub>6</sub>-gekoppeltem RGS5 und His<sub>6</sub>-gekoppeltem RGS16 befindet sich bei ca. 21 kDa bzw. 24 kDa).

RGS5-kodierenden Adenovirus-Vektor stieg allerdings auch die Proteinmenge von His<sub>6</sub>-gekoppeltem RGS5-Protein an (Abbildung 9).

#### 5.2.1.7 Markierung des F-aktin in glatten Gefäßmuskelzellen und *Life Cell Imaging* (Lebendzell-Mikroskopie)

Für die Visualisierung von F-Aktin wurde der adenovirale Vektor rAV-CMV-LifeAct (ibidi®) eingesetzt. Der Vektor LifeAct kodiert dabei für eine 17 Aminosäuren umfassende Aktin-Bindedomäne und die Gensequenz des rot fluoreszierenden Proteins (RFP). Wird die Aktin-Bindedomäne zusammen mit dem RFP nach Transduktion von der Zelle synthetisiert, kann sie an das endogene F-aktin binden und durch das RFP seine Visualisierung ermöglichen. Zellen wurden, wie zuvor beschrieben (s. 5.2.1.7), zur Transduktion vorbereitet. Das Virus wurde mit einer *multiplicity of infection* (MOI) 100 (100 infektiösen Einheiten (Viren)/Zelle) eingesetzt. Versuche starteten je nach experimentellem Verfahren frühestens 24 Stunden nach viraler Transduktion. Erfolgte zuvor eine virale Transduktion mit den GFP- bzw. RGS5-Adenoviren, so wurde der LifeAct-Vektor nach der Abnahme der GFP- oder RGS5-Adenoviren in die Zellen transduziert.

Mittels *Life Cell Imaging* konnte das Migrationsverhalten von zuvor mit dem rAV-CMV-LifeAct-Virus und Adenoviren mit dem Vektor für GFP bzw. RGS5 transduzierten HUASMCs (s. 5.2.1.5) innerhalb eines bestimmten Zeitfensters beobachtet werden. Nach 24 Stunden erfolgte die Aufnahme der Zellen für weitere 10 Stunden am Olympus IX83-Mikroskop. Durch die beheizbare Einfassung der Zellkulturplatte des Inkubationssystems (Tokai Hit) konnte das die Zellen umgebende Medium (Panserin ohne Zusätze) während des Versuchs konstant auf 37°C gehalten werden. Zudem wurde das Medium, in dem die Zellen inkubiert wurden, mit 5 % CO<sub>2</sub> begast.

#### 5.2.1.8 Herstellung von Sphäroiden aus arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen

Um HUASMCs weitestgehend im ruhenden Zustand zu erhalten und eine dreidimensionale Anordnung von GMZ zu gewährleisten, wurden sie in Sphäroiden (kugelförmige Zellaggregate), bestehend aus ca. 500 Zellen, kultiviert. Hierfür wurden HUASMCs wie beim Passagieren mit Trypsin/EDTA abgelöst und zur genauen Ermittlung der Zellanzahl unter Einsatz der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Für eine definierte Zellaggregatgröße wurde nach der Zellzählung für den Migrationsassay die Zellzahl auf 500 Zellen pro Sphäroid eingestellt. Um einen experimentellen Ansatz von 200 Sphäroiden zu generieren, der wiederum einen Versuchsansatz mit 4 Kollagengelen ermöglicht, wurden 100.000 Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Diese Zellen wurden in 16 ml DMEM (+ 30 % FKS) aufgenommen und mit 4 ml Methocel suspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine 96-Loch-Mikroplatte mit Rundboden für Suspensionskulturen gleichmäßig verteilt (100 µl/Loch) und

für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nachdem die Bildung der Sphäroide mittels Phasenkontrastmikroskopie geprüft wurde, wurden diese geerntet und in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml) gesammelt. Eine runde Form, ein klarer Randverlauf und eine goldene Farbe der Aggregate definieren eine erfolgreiche Sphäroidbildung. Zur Ernte der Sphäroide wurden Pipettenspitzen (1000 µl) mit einer zuvor mit 70 % Ethanol (v/v) gereinigten Schere an der Spitze um 2 mm gekürzt, um eine Schädigung der Sphäroide durch Scherkräfte zu verhindern. Um die Sphäroide vom methocelhaltigen Medium zu lösen, wurden die geernteten Sphäroide bei 1000 x g für 5 Minuten sedimentiert. Die so isolierten Sphäroide konnten nun im Gel-Migrationsassay eingesetzt werden.

## 5.2.2 Analyseverfahren kultivierter HUASMCs

### 5.2.2.1 Gel-Migrationsassay

Um das Portrusions- und damit Migrationsverhalten von GMZ beobachten und quantifizieren zu können, wurde in dieser Arbeit die Methode des Gel-Migrationsassays eingesetzt. Hierbei wurden Sphäroide in ein Kollagengel eingebettet und darin 24 Stunden kultiviert. Innerhalb dieser Zeit bilden sich je nach Behandlung aus dem Sphäroid heraus Zellprotrusionen, die ins Gel reichen. Durch die Ermittlung der kumulativen Länge der gebildeten Protrusionen kann die Migrationsfähigkeit der Zelle in Abhängigkeit der entsprechenden Behandlung ermittelt werden.

Für einen Ansatz aus 4 Gelen wurden zunächst 200 Sphäroide aus jeweils 500 Zellen geformt. Die geernteten Sphäroide wurden in einem Gemisch aus 6 ml Methocel und 4 ml FKS resuspendiert. Gleichzeitig wurden 4 ml gelöstes Kollagen I aus Rattenschwänzen mit 0,5 ml M199 (10x) gemischt. Das Kollagen I/M199-Gemisch wurde mit 0,5 ml sterilem NaOH (0,2 M) versetzt. Anschließend wurde ein Volumen Kollagen I/M199-Gemisch mit einem Volumen Methocel/FKS/Sphäroidgemisch zügig mit Hilfe einer serologischen Pipette (5 ml) durch Auf- und Abpipettieren gründlich und luftblasenfrei vermischt. Jeweils 1 ml dieser gleichmäßigen Mischung wurde in eine Vertiefung einer 24-Loch-Zellkulturplatte eingelassen. Während einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Gel polymerisiert und anschließend mit 100 µl DMEM (+ 30 % FKS) überschichtet, um eine Austrocknung der Gele zu verhindern. Die Sphäroide wurden bevor sie mikroskopisch untersucht wurden weitere 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In dieser Zeit konnten sich die Protrusionen der GMZ ausbilden.

Mit der Analysesoftware AnalySIS Image Processing 5.0v und unter Benutzung des 4x-Objektivs wurden die Sprosslängen der GMZ von jeweils 10 Sphäroiden pro Ansatz ermittelt und pro Sphäroid kumulativ zusammengefasst. Die kumulative Sprosslänge wird in der Einheit µm angegeben.

### 5.2.2.2 Gel-Migrationsassays mit unterschiedlicher Behandlung von HUASMCs

Um einen Einfluss der Proliferation von HUASMCs während der Migration ins Kollagengel auszuschließen und damit die tatsächliche Migration durch den Migrationsassay zu bestätigen, wurden sie mit dem selektiven *Cyclin-Dependent Kinase 4 and 6* (CDK4/6)-Hemmer PD0332991 (Palbociclib, 0,1  $\mu$ M) behandelt und zur Bildung von Sphäroiden eingesetzt (s. 5.2.2.1). Das auspolymerisierte Gel wurde anschließend mit 100  $\mu$ l DMEM (+30 % FKS) und PD0332991 (1 $\mu$ M) überschichtet. Die Gele der Kontrollgruppe wurden mit 100  $\mu$ l DMEM (+30 % FKS) und dem Lösungsmittel DMSO überschichtet. Der Effekt einer RGS5-Überexpression auf das Migrationsverhalten wurde untersucht, nachdem GMZ im Voraus mit dem Adenovirus-Vektor, kodierend für GFP, RGS5 bzw. RGS16, transduziert wurden. 24 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen abgelöst und ausgezählt und anschließend zur Bildung von Sphäroiden eingesetzt (s. 5.2.2.1). Der Transduktionachweis in den Zellen nach der Behandlung mit Adenoviren erfolgte durch die Ermittlung der GFP-spezifischen Fluoreszenzintensität mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops IX83.

Die Auswirkungen gehemmter  $G\alpha_{i/o}$ - und  $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheiten auf die Migration von HUASMCs wurde untersucht, indem die Zellen während der Sphäroidbildung die Inhibitoren Pertussistoxin (PTx) (200 ng/ml) und YM-254890 (2  $\mu$ M)) als Zusatz zum Medium erhielten. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich das Lösungsmittel DMSO.

Der Einfluss der Adenylatzyklase auf das Migrationsverhalten von HUASMCs wurde untersucht, nachdem diese während der Sphäroidbildung einen Stimulator der AC, Forskolin (25  $\mu$ M), als Zusatz zum Medium erhielten. Die auspolymerisierten Gele mit den Sphäroiden wurden zusätzlich mit Forskolin (25  $\mu$ M) überschichtet. Die Gele der Kontrollgruppe wurden mit 100  $\mu$ l DMEM (+30 % FKS) und dem Lösungsmittel DMSO überschichtet.

### 5.2.2.3 Lateraler MAoSMC-Migrationsassay

Zur zusätzlichen Evaluation der Migrationsfähigkeit von MAoSMCs wurden MAoSMCs aus Wildtyp Mäusen und aus RGS5-defizienten Mäusen getrennt in 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, worin zuvor sterile Silikonbarrieren platziert wurden. Hierfür wurden die Silikonbarrieren zuvor 10 Minuten in 70 % Ethanol (v/v) eingetaucht und anschließend für 30 Minuten in der Sicherheitswerkbank getrocknet und luftblasenfrei auf den Lochboden aufgesetzt. Anschließend wurden Zellen um diese Barrieren herum ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen über Nacht wurde das Nährmedium (DMEM + 15 % FKS) gewechselt und die Barrieren mit einer sterilen Pinzette abgelöst. So konnte nach Ablösen der Barrieren vom Lochboden die Schließung des zellfreien Bodenareals, durch die auf das freie Bodenareal migrierenden MAoSMCs, quantifiziert werden. In den folgenden 24 Stunden wurde die

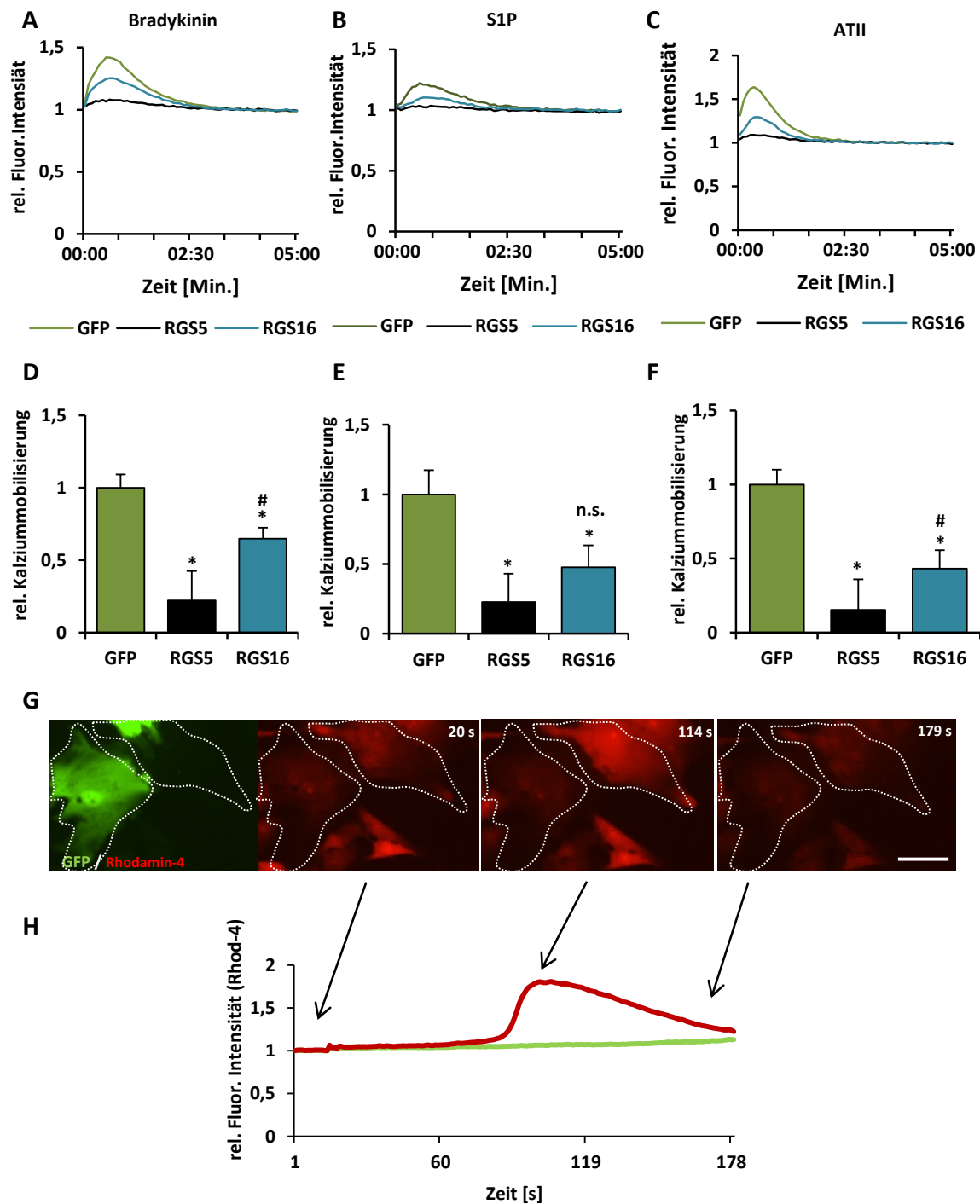
Distanz zwischen den Zellgrenzen mittels Okularmikrometer am Phasenkontrastmikroskop unmittelbar nach Entfernen des Blocks und vier, acht und 12 Stunden danach bestimmt.

#### 5.2.2.4 Messung der intrazellulären Kalziumionenfreisetzung in kultivierten HUASMCs nach Stimulation

Zur Ermittlung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurden HUASMCs in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit dem Adenovirus-Vektor, kodierend für GFP, dem Adenovirus-Vektor, kodierend für RGS5, oder dem Adenovirus-Vektor, kodierend für RGS16, transduziert und bis zu einer 90%igen Konfluenz auf dem Plattenboden kultiviert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit HBSS gewaschen. Anschließend erhielten sie zur Kopplung des intrazellulären Kalziums an den Farbstoff Rhodamin-4 Hepes (20 mM), Rhod-4 (Stock: 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (1:2000) und Pluronic F-127 (Stock: 10 %) (1:500). Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  im Inkubator und danach für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen mit den GPCR-Agonisten Bradykinin ( $\text{G}\alpha_{\text{q}/11}$ -Protein gekoppelte GPCRs<sup>52</sup>) (Abbildung 10 A, D), Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ( $\text{G}\alpha_{\text{q}/11}$ ,  $\text{G}\alpha_{\text{i/o}}$ ,  $\text{G}\alpha_{12/13}$ -Protein gekoppelte GPCRs<sup>116</sup>) (Abbildung 10 B, E) und Ang II ( $\text{G}\alpha_{\text{q}/11}$ ,  $\text{G}\alpha_{\text{i/o}}$ ,  $\text{G}\alpha_{12/13}$ -Protein gekoppelte GPCRs<sup>52</sup>) (Abbildung 10 C, F). Direkt nach Stimulation wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung anhand  $\text{Ca}^{2+}$ -gekoppelter Rhodamin-spezifischer Fluoreszenz im Fluorimeter (Ascent Software 2.6) gemessen. Die Messung der Absorption erfolgte für 5 Minuten jede fünfte Sekunde. In den Zellen, die RGS5 überexprimieren (schwarzer Graph), ist die Fluoreszenzintensität des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Rhodamin-4 nach Behandlung mit allen drei Stimuli deutlich niedriger als in HUASMCs, die ausschließlich GFP exprimieren (grüner Graph) (**Abbildung 10A-F**). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in den RGS16-überexprimierenden HUASMCs nach Bradykinin-, Ang II- und Sphingosin-1-Phosphat-Stimulation ist ebenfalls verringert im Vergleich zu HUASMCs, die nur GFP exprimieren. Dennoch fällt die Rhodamin-spezifische Fluoreszenzintensität in RGS5 überexprimierenden HUASMCs, verglichen zu der in RGS16-überexprimierenden HUASMCs nach Bradykinin- und Ang II-Stimulation, am schwächsten aus (Abbildung 10 D, F). Trotz der stärkeren  $\text{G}\alpha_{\text{q}}$ -Inhibitionsfähigkeit von RGS16 (s. Tabelle 1) blockt RGS5 die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in diesem Funktionalitätsnachweis signifikant stärker als RGS16. Die Ergebnisse der Auswertung dieser Experimente wurden von Dr. Anja Feldner durchgeführt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Für Einzelaufnahmen wurden die Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten kultiviert und wie oben beschrieben verfahren. Die Zellen wurden hierbei mit Bradykinin (0,01  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Die Bildaufnahmen erfolgten unmittelbar danach, innerhalb von drei Minuten jede zweite Sekunde am Olympus IX83 (CellSens, 1.12v). Auf Einzelzelebene wurden in RGS5-überexprimierenden HUASMCs (Abbildung 10 G, grün-fluoreszierende Zelle) z.T. bereits 24 Stunden nach Transduktion und Bradykinin-Stimulation keine Zunahme der Rhodamin-spezifischen Fluoreszenzintensität festgestellt (Abbildung

10 G, H, rot). Das bestätigt eine gehemmte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Da dieser Effekt von RGS5 bereits nach 24 Stunden Transduktion in GMZ deutlich ausfällt, wurden weitere Versuche regelmäßig 24 Stunden nach Transduktion begonnen.



**Abbildung 10 Nachweis der RGS5- und RGS16-Funktionalität nach adenoviraler Überexpression anhand intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung.** Die Funktionalität von RGS5 und RGS16 nach Überexpression (48 Stunden) in HUASMCs wurde anhand der Fluoreszenzintensität des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Rhodamin-4 bestimmt, nachdem die Zellen mit drei unterschiedlichen Stimuli, (**A, D**) Bradykinin (10 nM), (**B, E**) Sphingosin-1-phosphat (S1P) (10  $\mu\text{M}$ ) und (**C, F**) Angiotensin II (Ang II) (1  $\mu\text{M}$ ), behandelt wurden. Es wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten jede 5. Sekunde eine Aufnahme der Fluoreszenzintensität am Fluorimeter durchgeführt (A-C, dargestellt werden exemplarische Messungen, D-F, dargestellt werden die Mittelwerte der Area under curve als die relative Kalziummobilisierung bezogen auf den ersten Messwert) (D-F, \* $p \leq 0,05$ , GFP vs. RGS5, RGS16; # $p \leq 0,05$ , RGS5 vs. RGS16, nicht signifikant (n.s.), RGS5 vs. RGS16,  $n=3$ ). (**G**) HUASMCs wurden nach Transduktion (24 Stunden) mit Bradykinin (10 nM) stimuliert (rote Fluoreszenz: Rhodamin-4, grüne Fluoreszenz: GFP). (**H**) Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung einzelner Zellen (gestrichelte Linien) wurde mittels Rhodamin-4-Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$  innerhalb von 180 Sekunden am Olympus IX83 aufgenommen und quantifiziert (rote Kurve, nicht transduzierte Zelle, grüne Kurve: transduzierte Zelle, Maßbalken: 50  $\mu\text{m}$ ).



#### 5.2.2.5 Mikroarray-basierte Transkriptomanalyse (HuGENE Chip Affymetrix®)

Um das Transkriptom der HUASMCs zu untersuchen, wurden *Human Gene St 2.0 Arrays* der Firma Affymetrix® benutzt. Hierfür wurden Zellen mit Adenoviren transduziert, die den Vektor kodierend für GFP- bzw. für RGS5 enthalten (s. 5.2.1.5). Um das Transkriptom der HUASMCs nach biomechanischer Dehnung zu untersuchen, wurden die Zellen 18 Stunden nach Transduktionsbeginn für weitere sechs Stunden von 0 % - 15 % bei 0,5 Hertz zyklisch gedehnt. Somit ergaben sich für die Transkriptomanalyse vier Konditionen (GFP-überexprimierend, statisch (*gfp\_static*); GFP-überexprimierend (*gfp\_stretch*), gedehnt; RGS5-überexprimierend, statisch (*rgs5\_static*); RGS5-überexprimierend, gedehnt (*rgs5\_stretch*)). Die weitere Prozessierung der Proben und die Auswertungen erfolgten durch die Arbeitsgruppe von Prof. Norbert Gretz und Dr. Carsten Sticht (ZMF, Mannheim). Der statistischen Auswertung der gemessenen Transkriptwerte lag die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zugrunde. Die ermittelten logarithmischen Werte zur Basis zwei wurden durch einen Schwellenwert  $\geq 0,5$  bzw.  $\leq -0,5$  gefiltert.

Anhand einer *Gene set enrichment analysis* (GSEA) konnten zusätzlich Gensets erstellt werden, durch die putativ involvierte Zellstoffwechselwege ermittelt werden konnten. Diese Zellstoffwechselwege wurden durch die öffentlich zugängliche Datenbank *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) bezogen. In dieser Arbeit wurden nur ausgewählte, signifikant regulierte Signalwege dargestellt, die mit der Phänotypänderung von GMZ assoziiert werden. Ein nominaler p-Wert  $\leq 0,05$  diente als Signifikanzgrenze für die Signalweganalyse. Für die weiterführende Lektüre in die mathematische Statistik und GSEA-Methode sei an dieser Stelle auf die Ausarbeitung von Subramanian *et al.*<sup>117</sup> verwiesen.

#### 5.2.2.6 *In silico*-Analyse der quantifizierten Genexpression der RGS-Subfamilienmitglieder in humanem Gewebe

Die Darstellung der Expression der RGS-Transkripte anhand von RNA-Sequenzierungsdaten aus humanem Gewebe<sup>118,119</sup> wurde dem öffentlich zugänglichen GTex-Portal<sup>120</sup> entnommen. Die in der GTex-Datenbank dargestellte Quantifizierung der Genexpression erfolgte zum Zeitpunkt der *in silico*-Analyse nach der RPKM-Methode. Gewebe-spezifische Transkript-Datensätze der unterschiedlichen RGS-Gene wurden zur besseren Übersicht manuell zusammengefügt. Zum Recherchezeitpunkt ergaben die aus der Datenbank zur Verfügung gestellten Daten eine signifikante Transkriptexpression von RGS1, RGS5 und RGS16 in allen Geweben, außer der Blase, aufgrund der geringen Messwerte. Für RGS2 und RGS4 wird in der *A. Tibialis* keine signifikante Expression angegeben. Zur weiterführenden Lektüre zu dieser Methode wird an dieser Stelle auf die Publikationen von Melé *et al.*<sup>118</sup> und Mortazavie *et al.*<sup>121</sup> verwiesen.

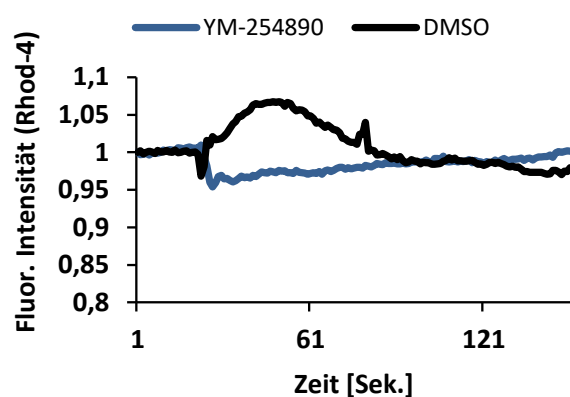
### 5.2.2.7 Analyse der Phosphorylierung unterschiedlicher Proteinkinasen und deren Zielproteinen (Proteome Profiler©)

Die simultane Analyse der Phosphorylierung von Kinasen und deren Zielproteinen in HUASMCs nach adenoviraler Transduktion und Überexpression von GFP und RGS5, wurde mit Hilfe des *Human Phosphokinase Array Kits* von R&D ermittelt. Detektiert werden Tyrosin-Kinasen, AGC-Kinasen der Gruppe der Proteinkinasen A-, G- und C-Familie, CMGC-Kinasen (u.a. Zykline und MAP-Kinasen), CAM-Kinasen (Kalzium- und Calmodulin-abhängige Kinasen) und STE Kinasen (können MAP-Kinasen aktivieren) sowie deren Zielproteine.

R&D stellt hierfür in seinem Array zwei kleine Membrane (Membran A und Membran B) mit 45 runden Kleinstarealen in Duplikaten bereit. Diese Flächen sind jeweils mit einem für eine bestimmte Phosphokinase spezifischen Primärantikörper bedruckt. Die Detektion der Phosphorylierung der Kinasen und deren Zielproteinen erfolgte nach Herstellerangaben. Für diesen Ansatz wurden Zellen transduziert mit Adenovirus-Vektoren, kodierend für GFP, RGS5 bzw. RGS16. Es erfolgte jeweils ein vierfacher Ansatz zum einen mit GFP-bzw. RGS5-kodierenden Vektoren und ein separater vierfacher Ansatz mit GFP- und RGS16-kodierenden Vektoren. Die HUASMCs wurden in runden Zellkulturschalen (100 mm<sup>2</sup>) kultiviert und transduziert (s. 5.2.1.5). Nach 24 Stunden erfolgte die Zelllyse zur Proteingewinnung. Die Chemilumineszenz wurde mithilfe des Image Quant LAS 4000 Mini detektiert. Die Grauintensität der einzelnen Punkte wurde mit der Analysesoftware ImageJ 1.49v quantifiziert.

### 5.2.2.8 Funktionalitätsnachweis von YM-254890 in HUASMCs

Die G-Proteinunterereinheit  $G\alpha_{q/11}$  wurde in den kultivierten GMZ mit der Substanz YM-254890 (Wako) gehemmt. YM-254890 ist ein zyklisches Depsipeptid, das aus dem Bakterienstamm *Chromobacterium* sp. QS3666 isoliert wurde und die  $G\alpha$ -Untereinheiten  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$  und  $G\alpha_{14}$  hemmen kann. Da eine der intrazellulären Signale, die von  $G\alpha_{q/11}$  abhängen, die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER ist, wird zur Überprüfung der Funktionalität von YM-254890 die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung nach Behandlung mit dem Inhibitor untersucht. Hierfür wurden HUASMCs 24 Stunden mit YM-



**Abbildung 11 Funktionalitätsnachweis von YM-254890 in HUASMCs nach Ang II-Stimulation.** Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Freisetzung wurde fluoreszenzmikroskopisch (Olympus IX83) erfasst und die Grauwerte der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit mit der Cell-Sens Software (1.12v) ausgewertet (blaue Linie: YM-254890-behandelte Zellen, schwarze Linie: Lösungsmittelkontrolle).

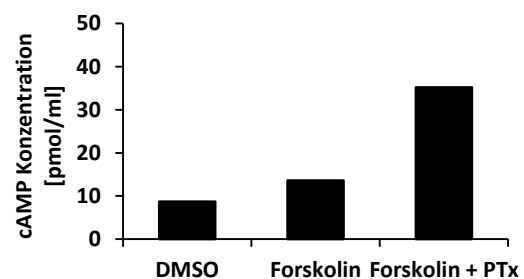
254890 (2  $\mu$ M) behandelt. Kontrollzellen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt.

Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen zur Erfassung der Kalziumfreisetzung (s. 5.2.2.4). Die HUASMCs wurden hierfür mit Ang II (1  $\mu$ M) stimuliert und aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität von  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenem Rhodamin-4 wurde innerhalb von 180 Sekunden fluoreszenzmikroskopisch (Olympus IX83) erfasst, mit der Software CellSens (1.12v) quantifiziert und auf den gemessenen Fluoreszenzwert vor dem Stimulus normalisiert.

#### 5.2.2.9 Funktionalitätsnachweis von Pertussistoxin und Forskolin in HUASMCs

Die G-Proteinuntereinheit  $\text{G}\alpha_{i/o}$  wurde in den kultivierten GMZ mit Pertussistoxin (Tocris) aus dem Bakterium *Bordetella pertussis* isoliert. Pertussistoxin setzt sich aus fünf Untereinheiten zusammen, die in zwei strukturelle Einheiten zusammengefasst sind. Das A Protomer bildet dabei eine katalytische Untereinheit, während das B Oligomer aus den vier Untereinheiten ein Rezeptorbindeelement formt. Es katalysiert die ADP-Ribosylierung der  $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten  $\text{G}\alpha_i$ ,  $\text{G}\alpha_o$  und  $\text{G}\alpha_t$  und verhindert dadurch die Interaktion der Untereinheiten mit den Rezeptoren, indem es die Bindung an den Rezeptor hemmt. Sobald der Rezeptor für  $\text{G}\alpha_{i/o}$  gehemmt wird, kann  $\text{G}\alpha_{i/o}$  sein Effektormolekül, die Adenylatzyklase, nicht hemmen. Ist die Adenylatzyklase ungehemmt aktiv, kann sie ATP in cAMP umwandeln und dadurch dessen Konzentration im Zytoplasma erhöhen.

Ein direkter Stimulator der AC ist Forskolin, ein bizyklisches Diterpen, das aus der Wurzel der Pflanze *Coleus forskohlii* extrahiert wurde. Es enthält die Eigenschaft die Adenylatzyklase (außer der Isoform AC9) an der Membran der GMZ rezeptorunabhängig zu aktivieren und dadurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration, wie PTx, zu erhöhen. Um die Funktionalität von Forskolin und Pertussistoxin in kultivierten GMZ zu bestätigen, wurden HUASMCs 24 Stunden mit Forskolin (Sigma Aldrich, 25  $\mu$ M) oder Forskolin und PTx (200 ng/ml) behandelt. Kontrollzellen wurden mit dem Lösungsmittel

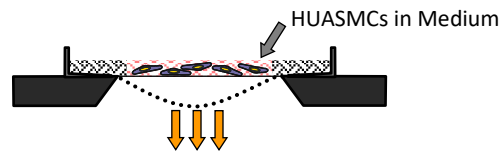


**Abbildung 12 Nachweis der Funktionalität von Forskolin und Pertussistoxin in HUASMCs.** Die Erfassung der cAMP-Konzentration nach Behandlung erfolgte mit Hilfe des cAMP-Assays (R&D).

DMSO behandelt (Abbildung 12). Die cAMP-Konzentration in den Zelllysaten wurde mithilfe des cAMP-Assays (R&D) bestimmt (s. 5.2.5.1). Die Ergebnisse wurden freundlicherweise von Dr. Caroline Arnold zur Verfügung gestellt.

### 5.2.3 Biomechanische Dehnung glatter Gefäßmuskelzellen

Um den Effekt einer *in vivo* erhöhten Wandspannung *in vitro* nachzuahmen, wurden GMZ auf flexiblen, Kollagen I beschichteten Elastomermembranen in 6-Loch-Zellkulturplatten kultiviert (Flexcell®) (Abbildung 13). Die Dehnung der Zellen erfolgte im Bereich 0 % - 15 % bei 0,5 Hertz bis zu 24 Stunden, die Dehnungsapparatur wurde mit der FX-5000 Software Version 1.0 betrieben. Die Zellen wurden anschließend, entsprechend des experimentellen Ansatzes, für die Isolierung von RNA oder Proteinen sowie für immunzytochemische Verfahren verwendet.



**Abbildung 13** Schematische Darstellung der mechanischen Dehnung von HUASMCs mit Hilfe des Flexcell® Systems.

### 5.2.4 Molekularbiologische Methoden

#### 5.2.4.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die Analyse der Genexpression wurde nach Beendigung des jeweiligen Versuchs zunächst RNA mittels des *RNeasy Mini* bzw. *Micro Kits* von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Zur Herauslösung, also Eluierung, der aus den lysierten Zellen gewonnenen RNA aus der *Kit*-eigenen Säulenmembran, wurden auf die Mitte der Membran 30-50 µl *Kit*-eigenes RNase-freies Wasser aufgetragen und 5 Minuten mit offenem Deckel bei Raumtemperatur gelagert. Die Konzentration des Eluats pro µl wurde spektralphotometrisch am Nanodrop-Gerät bestimmt. Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 5.2.4.2 RNA-Isolierung aus Gefäßen

Für die RNA-Isolierung aus murinen Arteriensegmenten wurden diese nach Beendigung des Experiments in 100 µl einer RNA-stabilisierenden Lösung (RNAlater®, Qiagen), aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelagert. Für die RNA-Gewinnung wurden die Gefäße in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl Trizol überführt und zum homogenisieren mit einer Stahlkugel (5 mm) bestückt. Mit einem Gewebezerkleinerer wurden die Gefäße bei 60 Schlägen pro Sekunde für zweimal 75 Sekunden zerkleinert und auf Eis gelagert. Die Prozessierung der Probe erfolgte mittels *RNeasy Micro-Kit*® (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 14 µl RNase-freies Wasser eluiert, die RNA-Konzentration pro einem µl spektralphotometrisch bestimmt und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 5.2.4.3 cDNA-Synthese

Um aus der isolierten RNA komplementäre cDNA zu generieren, wurde das Sensiscript® *Reverse Transcription Kit* von Qiagen verwendet. Nachdem der Reaktionsansatz (s. 5.1.1.2, Reaktionsansatz: cDNA-Synthese) zusammengesetzt wurde, wurde das Reaktionsgemisch für eine Stunde bei 37°C unter schütteln inkubiert und anschließend mit dem *Kit*-eigenen RNase-freien Wasser verdünnt.

#### 5.2.4.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der Genexpressionsunterschiede einzelner Proben mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde das LightCycler® 480 SYBR Green I Master-Gemisch (Roche) verwendet. Dieser setzt sich zusammen aus der FastStart™ Taq-Polymerase, den entsprechenden Nukleotiden (dUTP), Reaktionspuffern und dem DNA-Doppelstrang spezifischen SYBR®-Green Farbstoff. Dem Ansatz wurden laboreigene Primer und cDNA hinzugefügt (s. 5.1.1.2, Reaktionsansatz: quantitative Echtzeit-PCR). Daraufhin erfolgte der Amplifikationsvorgang nach Tabelle 2 unter der Nutzung des ROTOR-Gene® Q (Qiagen) und der ROTOR-Gene® Q Software (Qiagen). Der Ermittlung der n-fachen Expression des Zielgens lag der Ansatz nach Pfaffl<sup>122</sup> zugrunde.

Tabelle 2 Reaktionsbedingungen für die quantitative Echtzeit-PCR

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Template-Denaturierung	95°C	15 Min.	40x
Quantifizierung	95°C	15 Sek.	
Primerhybridisierung	Primer-spezifisch	30 Sek.	
Elongation	72°C	30 Sek.	
Finale Template-Denaturierung	95°C	0 Sek.	
	60°C	10 Sek.	
	95°C	0 Sek.	
Finale Extension	72°C	10 Min.	
Kühlung	4°C	∞	

#### 5.2.4.5 Erstellen von Bakterienkulturen

Das zur Erstellung der transgenen Maus benötigte *Bacterial Artificial chromosome*-Plasmid (BAC) wurde von der Firma GenScript in einer Auftragsarbeit generiert. Zur Überprüfung des erstellten BAC-Plasmids wurde zunächst eine Plasmidisolierung durchgeführt. Hierfür wurde zuvor ein Bakterienausstrich aus dem Glycerolstock #428881-1 mit dem Klon X77041 auf einer Kanamycin-haltigen (20 µg/ml) Agarplatte getätigt und über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend Klone gepickt und in einer 5ml Flüssigkultur bei 37°C über Nacht unter Schütteln (180 rpm) vermehrt.

#### 5.2.4.6 Plasmidisolierung

Für die niedrigkonzentrierte Plasmidaufreinigung, der sogenannten Mini-Präparation zur BAC-Aufreinigung, wurde die alkalische Lyse durchgeführt. Hierfür wurden 5 ml Bakterienkulturen bei 4°C für 10 Minuten bei 3000 x *g* sedimentiert und jeweils in 250 µl P1-Puffer (RNase A, 0,1 mg/ml) aufgenommen, resuspendiert und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurden 250 µl P2-Puffer dazugegeben und das Gefäß 5 Minuten bei Raumtemperatur invertiert, dann mit 500 µl P3-Puffer gemischt und anschließend 15 Minuten bei 4°C mit 19.000 x *g* zentrifugiert. Vom Überstand wurden maximal 900 µl in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 600 µl Isopropanol gefällt. Das Gemisch wurde erneut 30 Minuten bei 4°C mit 19.000 x *g* zentrifugiert. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde vorsichtig mit 70 % eiskaltem Ethanol (v/v) gewaschen und bei 56°C auf einem Heizblock 15 Minuten mit geöffnetem Deckel getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde dann in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und eine Stunde bei 56°C auf dem Heizblock durch Schütteln in Lösung gebracht.

Anschließend wurde das BAC-Plasmid mittels Restriktionsverdau in kleinere Fragmente aufgeteilt. Die erfolgreiche Aufteilung wurde durch einen Agarose-Gelauftrag nachgewiesen. Hier wurde das aufgereinigte Plasmid, wie im Reaktionsansatz (s. 5.1.1.2, Reaktionsansatz: BAC-Plasmid Restriktionsverdau) beschrieben, eine Stunde bei 37°C verdaut.

Für die Plasmidaufreinigung im Großformat, der sogenannten Maxi-Präparation zur BAC-Aufreinigung, wurde ebenfalls die alkalische Lyse durchgeführt. Hierzu wurden 400 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur mit 3000 x *g* 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakteriensediment in 12 ml P1 (RNase A, 0,4 mg/ml) resuspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum resuspendierten Sediment wurden 12 ml Lysepuffer (P2) hinzugegeben, manuell vorsichtig invertiert und acht Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde gekühlter Neutralisationspuffer (P3) hinzugefügt, manuell vorsichtig invertiert und acht Minuten auf Eis inkubiert und danach 15 Minuten bei 4°C mit 1700 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter in ein 50 ml Reaktionsgefäß gefiltert. Zum Filtrat wurden unter dem Sicherheitsabzug 2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gegeben und vorsichtig 1 Minute geschwenkt und zur phasischen Auftrennung 15 Minuten bei 4°C mit 1700 x *g* zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt, erneut mit 2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und ein weiteres Mal 15 Minuten bei 4°C mit 1700 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase von der unteren Phase abgetrennt, in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß transferiert, das 0,7-fache Volumen Isopropanol hinzugegeben und manuell invertiert, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Anschließend wurde der Ansatz eine Stunde bei 4°C mit 1700 x *g* zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment erneut kurz zentrifugiert und die restliche Flüssigkeit im Überstand entfernt.

Das Sediment wurde in 1 ml TE-Puffer gelöst, in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und unter dem Sicherheitsabzug mit 1 ml Chloroform versetzt, 30 Sekunden gemischt und 5 Minuten mit 19000 x *g* zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues, steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 1 ml Chloroform 30 Sekunden gemischt und 5 Minuten bei 19000 x *g* zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 700 µl Isopropanol versetzt und vorsichtig invertiert, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Das Gemisch wurde 15 Minuten bei 4°C mit 19000 x *g* zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das Sediment mit 1 ml 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Sediment bei 37°C auf einem Heizschüttler (300 rpm) getrocknet und anschließend in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 5.2.4.7 Restriktionsverdau zum Linearisieren des BAC-Konstrukts

Der Restriktionsverdau zum Linearisieren des BAC-Konstrukts erfolgte durch das Enzym NotI (s. M&M, Reaktionsansatz: Plasmid-Linearisierung). Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C. Die Restriktionsendonuklease NotI schneidet zweimal außerhalb des informationstragenden Gen-Abschnitts im BAC-Vektorrückgrat. Dabei entstanden zwei Produkte mit unterschiedlicher Größe, 90.239 bp (Insert mit Transgen) und 8.734 bp (Vektorrückgratrest).

#### 5.2.4.8 BAC-DNA-Dialyse zur Pronukleusinjektion

Die Dialyse des gewonnenen Inserts mit Transgen, das die aufgereinigte BAC-DNA beinhaltet, erfolgte bei unseren Kollaborationspartnern am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, nachdem das Produkt den zugrundeliegenden Reinheitskriterien entsprach.

Alle Arbeiten zur Plasmidlinearisierung und -injektion (s. 5.2.4.7 und 5.2.4.8) wurden mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nina Wettschureck am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in der Abteilung Pharmakologie durchgeführt.

#### 5.2.4.9 Genotypisierung der Mauslinie CreERT-SMMHC-LSL-RGS5

Die Genotypisierung der Mauslinie CreERT-SMMHC-LSL-RGS5 erfolgte mittels semiquantitativer Standard-Polymerase-Kettenreaktion. Zur Bestätigung des Genotyps der Mauslinie CreERT-SMMHC-LSL-RGS5 wurden 2-3 mm lange Schwanzspitzenbiopsien in Proteinase K-Lysepuffer bei 56°C über Nacht unter ständigem Schütteln lysiert. Am nächsten Tag wurde die Aktivität der Proteinase K durch Erhitzen der Probe bei 65°C für 10 Minuten gestoppt. Zur Sedimentierung von Geweberesten wurde die Probe eine Minute bei Raumtemperatur bei 400 x *g* zentrifugiert, der Überstand, der die

extrahierte DNA enthielt, anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Der Nachweis über den Einbau des SM-MHC-CreER<sup>T2</sup>-Genabschnitts ins Genom der transgenen Mäuse erfolgte durch einen Reaktionsansatz mit drei Primerpaaren mittels Standard-PCR (s. 5.1.1.2, Reaktionsansatz: SM-MH/Cre Standard-PCR). Die Reaktionsbedingungen sind dabei in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgelistet. Da bei der CreERT-SMMHC-LSL-RGS5 Mauslinie neben dem SM-MHC-CreER<sup>T2</sup>-Nachweis auch die Integration des BAC-Konstrukts erfolgen muss, das den zusätzlich kodierenden Abschnitt des RGS5-Gens beinhaltet, wurden zur vollständigen Genotypisierung zwei Standard-PCRs durchgeführt. Zum Nachweis der SM-MHC-CreER<sup>T2</sup> wurden die Primer #6, #7 und #8 und zum Nachweis des RGS5-BAC-Konstrukts die Primer #3, #4 und #5 eingesetzt (s. 5.1.5.2).

Tabelle 3 Reaktionsbedingungen für Standard-PCR für SM-MHC-CreER<sup>T2</sup>

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Template-Denaturierung	95°C	10 Min.	
Denaturierung	95°C	45 Sek.	30x
Primerhybridisierung	58°C	45 Sek.	
Elongation	72°C	2 Min.	
Finale Extension	72°C	10 Min.	
Kühlung	4°C	∞	

Tabelle 4 Reaktionsbedingungen für Standard-PCR für RGS5-BAC

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Template-Denaturierung	94°C	5 Min.	
Denaturierung	94°C	45 Sek.	35x
Primerhybridisierung	61°C	45 Sek.	
Elongation	72°C	45 Min.	
Finale Extension	72°C	10 Min.	
Kühlung	4°C	∞.	

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit 6-fachem DNA-Probenpuffer (Endkonzentration Probenpuffer 1x) versetzt. Davon wurden 20 µl auf ein 1%iges Agarosegel mit 0,03 % Ethidiumbromid (v/v) aufgetragen und in einer mit 0,5-fachem TBE-Puffer befüllten Kammer für 60 Minuten bei 120 V aufgetrennt. Die Geldokumentation erfolgte mit dem Gel Doc XR+ System und der Quantity One Software (Bio-Rad).



## 5.2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 5.2.5.1 Konzentrationsbestimmung von zyklischem Adenosinmonophosphat

Für die Messung der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat in HUASMCs nach PTx- und Forskolin-Behandlung wurde das *cAMP Parameter Assay Kit* (R&D Systems) eingesetzt und nach dem Herstellerprotokoll angewandt. Die Zellen wurden zuvor bei einer Zelldichte von ca. 70 % pro 9,5 cm<sup>2</sup> in einer 6-Loch-Zellkulturplatte adenoviral transduziert. Nach 24 Stunden erfolgte der Wechsel von serumfreiem Medium (Panserin) in serumhaltiges Nährmedium (DMEM, 15 % FKS). Nach insgesamt 48 Stunden wurden die Zellen weitere 24 Stunden mit Forskolin (20 µM) und PTx (200 ng/ml) im serumhaltigen Nährmedium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für den Einsatz im cAMP-Assay wurden die Zellen nach dem Ablösen vom Plattenboden mechanisch zerstört, indem sie dreimal bei -20°C eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Die Durchführung des Versuchs und Bereitstellung der Ergebnisse erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Dr. Caroline Arnold.

### 5.2.5.2 Proteinisolierung

Zur Gewinnung von Proteinen aus HUASMCs wurden die Zellen zunächst mit HBSS (4°C) gewaschen. Zu jeder Vertiefung der 6-Loch-Zellkulturplatte wurde 100 µl des Lysepuffers (90 µl RIPA-Puffer und 1 µl HALT Protease-/Phosphatase-Mix) hinzugegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mehrmals auf- und abpipettiert und weitere 15 Minuten unter regelmäßigem Mischen (alle 5 Minuten à fünf Sekunden) auf Eis inkubiert. Um zelluläre Reste zu sedimentieren, wurde das Lysat 15 Minuten bei 4°C mit 17000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 5.2.5.3 Gelelektrophoretische Proteinauftrennung (SDS-PAGE)

Der Proteingehalt der verwendeten Proben wurde mit dem entsprechenden Volumen Lysepuffer auf ca. 1 µg/µl verdünnt. Mindestens 20 µg und maximal 30 µg Gesamtproteinmenge wurden mit vierfachem Ladepuffer nach Laemmli versetzt und bei 95°C unter schütteln 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze eine Minute auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Gele wurden in die Western-Blot-Apparatur (BioRad, München) eingespannt und leere Kammern wurden mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben mit denaturiertem und reduziertem Protein sowie der Proteinmarker (Precision Plus Protein™ *Dual Color Standards*, 10-250 kDa, Bio-Rad)

wurden in die Geltaschen des Sammelgels geladen, bei 80 V zunächst gesammelt und bei 100 V getrennt.

#### 5.2.5.4 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden nach dem Western Blot-Verfahren aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die PVDF-Membran mit 100 % Methanol für 5 Minuten aktiviert und anschließend dreimal für 5 Minuten mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die PVDF-Membran wurde dann auf einer Gelhaltekassette auf doppeltem Filterpapier platziert, das wiederum auf einem Schwamm auflag. Darauf wurde das Trenngel platziert und mit doppeltem Filterpapier und Schwamm abgedeckt. Diese Kassette wurde anschließend in eine mit Transferpuffer befüllte Wet-Blot-Transferkammer eingespannt und mit einer Kühlbatterie bestückt. Der Transfer fand bei 350 mV für 60 Minuten statt. Um den erfolgreichen Transfer zu bestätigen, wurde die Membran mit Ponceau S 5 Minuten eingefärbt und anschließend zweimal mit H<sub>2</sub>O drei Minuten gewaschen. Zum Entfärben wurde die Membran ein weiteres Mal mit TBS-T (0,05 %) gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde sie eine Stunde lang in einem 50 ml-Reaktionsgefäß mit Blockierlösung auf einem Rollmischer bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primärantikörper wurde abhängig von Herstellerangaben in 3 % BSA/TBS-T oder 5 % Blotto/TBS-T verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht auf dem Rollmischer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, mit verdünntem Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Zur Detektion wurde die ECL-Lösung auf die Membran aufgetragen, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und die Chemilumineszenz mit dem Image Quant LAS 4000 Mini (GE Healthcare) aufgenommen. Die Quantifizierung der Grauintensitäten der Banden erfolgte mit dem Programm ImageJ 1.49v.

Um den unphosphorylierten Proteinanteil des jeweiligen Proteins in den Proben nachzuweisen, wurde das sogenannte *Membrane-Stripping* durchgeführt. Hierfür wurde die PVDF-Membran nach der Detektion des phosphorylierten Proteins dreimal 5 Minuten mit TBS gewaschen und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur in *Stripping*-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 5 Minuten gründlich mit TBS gewaschen, eine Stunde mit der entsprechenden Blockierlösung beschichtet und gelagert. Im Anschluss daran wurde der entsprechende, phosphospezifische Primärantikörper auf die Membran aufgetragen und diese über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Sekundärantikörperbindung und Detektion des Proteins.

#### 5.2.5.5 Nachweis von RhoA-GTP

GTP-gebundenes RhoA wurde in Gesamtzelllysaten von HUASMCs mittels G-Lisa® *RhoA Activation Assay* (Cytoskeleton Inc.) nachgewiesen. Vor Beginn des Assays wurden die Proteinlysate mit dem Kit-eigenen Lysepuffer auf die gewünschte Proteinkonzentration (0,8 mg/ml) eingestellt. Die Lysataufbereitung und -bearbeitung wurde nach Herstellerangaben gemäß dem Kit-Protokoll durchgeführt.

Parallel zum G-Lisa wurde das Gesamt-RhoA in der restlichen Proteinprobe mittels Western Blot (s. 5.2.5.4) detektiert. Mit den Werten aus der Auswertung der Grauintensitäten der Banden aus dem Western Blot wurden die errechneten OD-Werte der Proben aus dem G-Lisa Verfahren normalisiert.

### 5.2.6 Fluoreszenzbasierte Analyseverfahren

#### 5.2.6.1 Immunfluoreszenzfärbung fixierter Gefäßmuskelzellen

HUASMCs wurden mit HBSS (4°C) gewaschen und mit 1 ml 100 % Methanol (-20°C) pro Vertiefung für 15 Minuten bei 4°C fixiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur am Sicherheitsabzug getrocknet. Danach wurde der zu färbende Bereich mit einem wasserabweisenden Stift umrahmt und 30 Minuten mit Casein-Blockierlösung blockiert, um unspezifische Bindungen zu sättigen. Der Primärantikörper wurde mit Casein-Blockierlösung verdünnt und zwei Stunden auf den Zellen bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flächen wurden anschließend dreimal 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde entsprechend in Casein-Blockierlösung verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die definierte Fläche aufgetragen. Nachfolgend wurde zweimal 5 Minuten mit TBS-T und einmal 5 Minuten mit PBS gewaschen und die Zellkerne 10 Minuten lichtgeschützt mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) (1:2500 in PBS) inkubiert. Abschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Fläche mit einem Deckgläschen und Mowiol eingedeckt. Die Präparate wurden bei 4°C gelagert. Die Mikroskopie der Präparate erfolgte innerhalb der nächsten drei Tage mit dem Olympus IX83-System. Die Aufnahmen wurden mittels CellSens Software (1.12v) durchgeführt. Zur Analyse der spezifischen Fluoreszenzintensitäten im Zytoplasma oder im Zellkern wurden die Grauwerte mit ImageJ 1.49v ausgewertet. Es wurden hierfür mindestens drei, maximal fünf Gesichtsfelder pro gefärbte Fläche aufgenommen und ausgewertet.

#### 5.2.6.2 Aktinmarkierung in fixierten Zellen

Die Zellen wurden mit HBSS (4°C) gewaschen und mit 1 ml kaltem 4%igem PFA (w/v) pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte für 15 Minuten fixiert. Anschließend wurde das PFA dekantiert und die

Zellen dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurde die Zellmembran unter Einsatz von 0,1%igem Triton X-100 innerhalb von 5 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Zellen wurden 5 Minuten mit H<sub>2</sub>O gewaschen und unter dem Sicherheitsabzug getrocknet. Um Färbereiche zu definieren, wurden kleine Bereiche mit einem wasserabweisenden Stift eingekreist und die darin befindlichen Zellen zehn Minuten in PBS rehydriert. Mittels Alexa Fluor® 488-konjugiertem oder Alexa Fluor 546®-konjugiertem Phalloidin (5 U/ml in PBS) konnte F-Aktin gefärbt werden, während G-Aktin durch Alexa Fluor® 488-konjugierte Desoxyribonuklease I (DNaseI, 10 µg/ml in PBS) markiert wurde (nur eingesetzt bei Alexa Fluor® 546-konjugiertem Phalloidin). Die Einwirkung der Farbstoffgekoppelten Substanzen fand innerhalb von 20 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurden die Zellen dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit DAPI (2 µg/ml in PBS) 10 Minuten bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckt. Die Präparate wurden bei 4°C bis zum nächsten Tag dunkel gelagert oder am gleichen Tag mit dem Olympus IX83-System mikroskopiert und der CellSens-Software (1.12v) aufgenommen.

### 5.2.7 Generierung einer CreERT-SMMHC-LSL-RGS5-Maus

In einem Mikroinjektionsverfahren wurde durch unsere Kollaborationspartner am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung die Keimbahnmanipulation zur Herstellung transgener Mäuse vorgenommen (s. 5.2.4.8). Die Details dieser Technik können aus der Referenzpublikation<sup>123</sup> entnommen werden.

#### 5.2.7.1 Induktion der RGS5-Überexpression in Gewebe und Zellen aus transgener Maus

Zur CreER<sup>T2</sup>-abhängigen Induktion der RGS5-Überexpression in den generierten transgenen Mäusen wurde Tamoxifen benötigt. Die *in vivo*-Induktion mit Tamoxifen erfolgte in einem transgenen Tier, das positiv auf das Konstrukt und SM-MHC getestet war. Als Kontrolltier wurden nicht-transgene Tiere verwendet. Dazu erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion von Tamoxifen (1 mg/kg pro Tag) gelöst in 50 µl Miglyol pro Injektion über 5 Tage. Nach 28 Tagen wurde das Tier zur Perfusion und Gewebeentnahme nach CO<sub>2</sub>-Narkose mit zervikaler Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung aus dem entnommenen Gewebe mit dem *RNeasy Micro-Kit* (s. 5.2.4.2).

Die Tiere der Linie SM-MHC-CreER<sup>T2</sup> gingen aus der Verpaarung von Nicht-Träger (*Noncarrier*) Weibchen und hemizygoten Männchen hervor. Das hemizygoten Männchen ist in dem Fall der Träger. Das Konstrukt befindet sich zudem nur auf dem Y-Chromosom und wird dadurch auch nur an die männlichen Nachkommen weitervererbt. Zur Überprüfung der Überexpressionsinduktion in weiblichen Tieren, die das SM-MHC-CreER<sup>T2</sup> Konstrukt demnach nicht haben sollten, wurden Zellen

aus der Aorta der weiblichen Nachkommen isoliert und in 24-Loch-Zellkulturplatten kultiviert. Nach Erlangung einer 80%igen Zellkonfluenz wurden die Zellen mit rekombinanter TAT-Cre-Rekombinase (100 U/ml) über Nacht behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert (s. 5.2.4.1). Die hier benutzte TAT-Cre-Rekombinase ist ein zellpermeables Fusionsprotein bestehend aus einem Proteintranslokationspeptid TAT, einer nukleären Lokalisationssequenz (NLS), dem Cre Protein und einem N-terminalen Histidin-Anhang (His<sub>6</sub>).

### 5.2.8 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden als Mittelwert mit positiver Standardabweichung (+ SD) dargestellt, falls in der Legende nicht anders angegeben. Die Signifikanz normalverteilter Werte zweier experimenteller Gruppen wurde mittels ungepaartem T-Test (*Student's T-test*) analysiert. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  galt dabei als signifikant und wird mit einem \* gekennzeichnet, während ein p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* und ein p-Wert  $\leq 0,001$  mit \*\*\* dargestellt wird. Aufgrund der schwächeren Aussagekraft von Versuchen mit einer n-Zahl von drei, wird hier bei errechneter Signifikanz stets der p-Wert  $\leq 0,05$  angegeben. Für die Signifikanzanalyse von normalverteilten Werten aus drei oder mehr experimentellen Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) in Kombination mit einem Tukey Post-Hoc-Test durchgeführt. Die Signifikanzeinteilung gilt hier ebenso, wie vorstehend beschrieben.

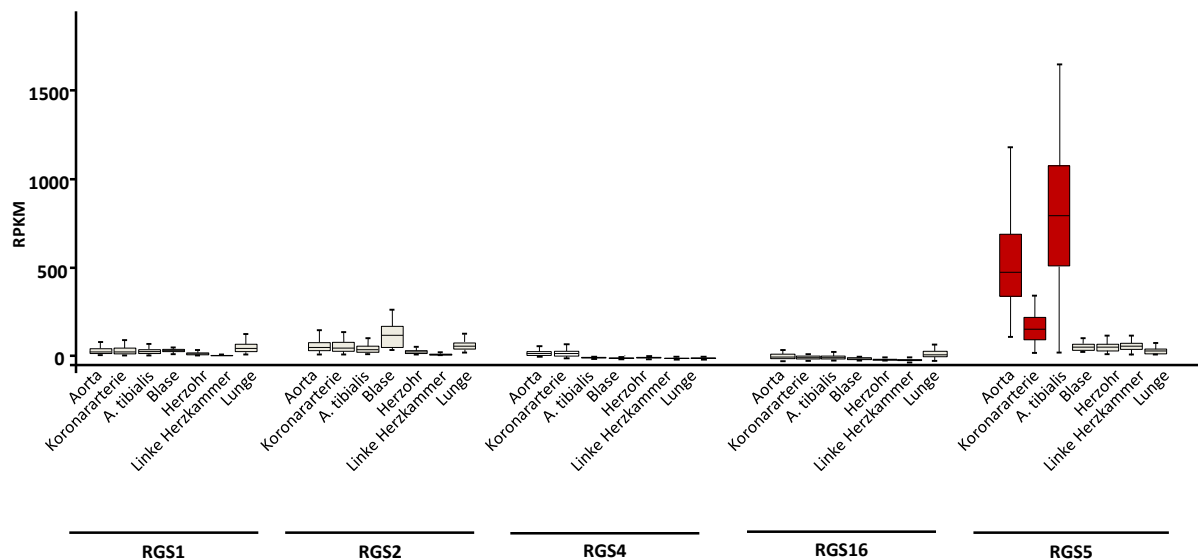
## 6 Ergebnisse

### 6.1 Der Einfluss von RGS5 auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen

Vorangegangene Untersuchungen in unterschiedlichen Kontexten wiesen auf eine Beteiligung von RGS5 bei Gefäßwandumbauprozessen hin. Den bisherigen Untersuchungen gemein ist die Beteiligung von GMZ an den Gefäßwandumbauprozessen. Während belegt werden konnte, dass RGS5 in mehrere, unterschiedlich bedingte Remodellierungsprozesse der Gefäßwand *in vivo* involviert ist, fehlen Untersuchungen zur grundlegenden Beeinflussung des Phänotyps von GMZ durch RGS5. Aus diesem Grund sollte in einem ersten Schritt die RGS5-mRNA-Expression im Vergleich zu weiteren RGS-Proteinen der B/R4-Subfamilie, die ebenfalls eine Rolle im kardiovaskulären System spielen, anhand einer *in silico*-Analyse untersucht werden.

#### 6.1.1 *In silico*-Analyse der RGS5-Expression in humanem Gewebe im Vergleich zu weiteren B/R4 Subfamilienmitgliedern

RGS-Proteine der B/R4-Subfamilie werden häufig verknüpft mit ihrem Vorkommen und ihrer Funktion im kardiovaskulären System (s. 4.4.1)<sup>82,93</sup>. Um herauszufinden, wie stark RGS5 im Vergleich zu weiteren Mitgliedern der B/R4 Subfamilie (RGS1, RGS2, RGS4, RGS5 und RGS16) in Organen mit einem großen Anteil glatter Muskelzellen sowie dem Herzen exprimiert ist, wurde eine *in silico*-Analyse anhand der GTex Datenbank durchgeführt. Hierbei wurden die mRNA-Spiegel in der Aorta, der Koronararterie, der *A. tibialis*, im Herzohr der linken Herzkammer, in der Lunge und der Blase für jedes Mitglied der RGS-Subfamilie einzeln verglichen (Abbildung 14). Es fiel auf, dass RGS5 v.a. in der Aorta, den Koronararterien und in der *A. tibialis* exprimiert ist. Zusätzlich war die RGS5-Genexpression in großen Arterien stärker ausgeprägt als in kleineren Leitungsarterien. Bis auf RGS2 im Blasengewebe, zeigten weder RGS1, RGS4 noch RGS16 eine auffällige Expression in den vorgenannten Organen bzw. Blutgefäßen.



**Abbildung 14 Zusammenstellung von Sequenzierdatenvergleichen einzelner B/R4-Subfamilienmitglieder in unterschiedlichen Geweben.** Das Diagramm zeigt die RNA-Expressionshäufigkeit von RGS1, RGS2, RGS4, RGS16 und RGS5 in humanem Gewebe. Die relative Expressionshäufigkeit des RGS5-Transkripts hebt sich in der Aorta, der Koronararterie und der *Arteria tibialis* (*A. tibialis*) hervor (rote Balken). Die Datenpunkte stammen aus dem öffentlich zugänglichen GTEx-Portal<sup>120</sup>. Die relative Genexpression der RGS-Subfamilienmitglieder wurde zur Quantifizierung zu diesem Zeitpunkt in RPKM dargestellt (*Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*). Die Balken in der Darstellung stellen den Median, das untere Quantil als 25. und das obere Quantil als 75. Perzentile dar. (n=299 (Aorta), n=173 (Koronararterie), n=441 (*A. tibialis*), n=11 (Blase), n=297 (Herzohr), n=303 (Linke Herzkammer), n=427 (Lunge)). Für weitere Angaben zur Methode s. 5.2.2.6.

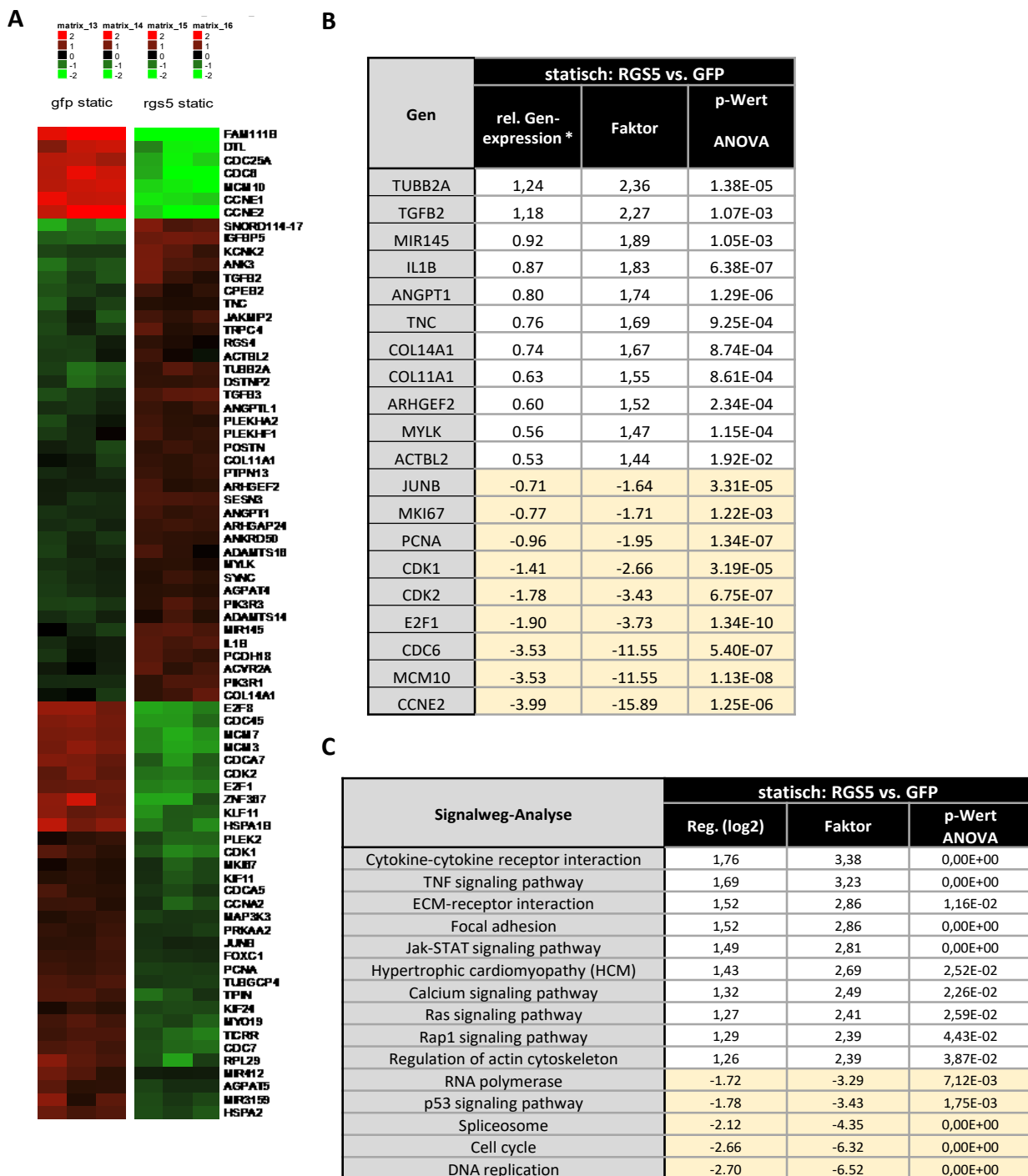
### 6.1.2 Untersuchung des Einflusses von RGS5 auf das Transkriptom glatter Gefäßmuskelzellen

Die verstärkte Expression von RGS5 in großen Gefäßen (s. Abbildung 14) deutet auf eine besondere Bedeutung von RGS5 im arteriellen System hin. Um einen grundlegenden ersten Eindruck vom Einfluss von RGS5 auf den Phänotyp von GMZ zu erhalten, wurde zunächst eine Transkriptomanalyse mittels Mikroarraytechnologie (s. 5.2.2.5) durchgeführt. Dazu wurde RGS5 in HUASMCs überexprimiert. Die Untersuchung des Transkriptoms ergab eine signifikant veränderte Genexpression in HUASMCs nach RGS5-Überexpression (Abbildung 15 A).

So zeigte sich in der Transkriptomanalyse von statisch kultivierten HUASMCs, die RGS5 überexprimieren, eine im Vergleich zur Kontrollgruppe schwächere Expression von Genen, die mit der Zellproliferation assoziiert werden. Solche Gene sind *junB proto-oncogene (JUNB)*, *marker of proliferation ki-67 (Ki-67)*, *proliferating cell nuclear antigen (PCNA)*, *cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)*, *cyclin-dependent kinase D 2 (CDK2)*, *cell division control protein 6 (CDC6)*, *G1/S-specific cyclin-E2 (CCNE2)* und *E2F transcription factor 1 (E2F1)*<sup>114,124,125</sup>. Ebenso waren Gene betroffen, die für extrazelluläre Matrixproteine kodieren wie *collagen type XIV alpha 1 chain (COL14A1)*, *collagen type XI alpha 1 chain (COL11A1)* und *Tenascin C (TNC)*<sup>71,126,127</sup>. Außerdem waren Transkripte von Genen, die mit dem kontraktile Phänotyp von GMZ, wie *MIR-145* und *MYLK*<sup>128–130</sup>, bzw. dem Zytoskelett assoziiert werden, wie *tubulin beta 2A class IIa (TUBB2A)* und *actin beta like 2 (ACTBL2)*, betroffen (Abbildung 15 B)<sup>131,132</sup>. Die Zuordnung der signifikant regulierten Gensets zu zellulären Signalwegen

erfolgte mittels GSEA (s. 5.2.2.5). Die Gruppierung der veränderten Gene suggeriert eine signifikante Hemmung der DNA-Replikations- bzw. Zellzyklussignalwege, der Signalwege zur Anordnung des Zytoskeletts und fokalen Adhäsion sowie der ECM-Integrin Interaktion (Abbildung 15 C). Zusammenfassend zeigt sich als primäres Ergebnis der Transkriptomanalyse nach RGS5-Überexpression eine verminderte Expression von Genen, die mit der Proliferation von GMZ assoziiert werden.

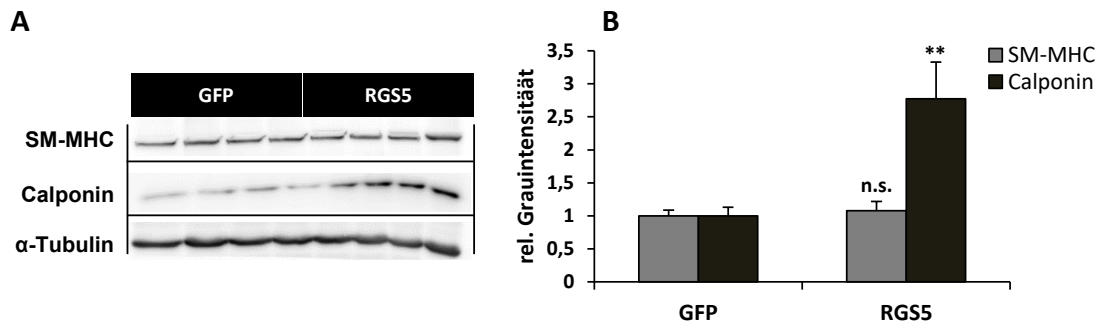




**Abbildung 15** Transkriptomanalyse nach RGS5-Überexpression in HUASMCs. **(A)** Liste aus regulierten Genen in einer *Heatmap*-Darstellung (grün: schwächere bzw. rot: stärkere Expression des jeweiligen Transkripts in RGS5-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu GFP-überexprimierenden Zellen). **(B)** Liste von ausgewählten Genen, die bei erhöhter RGS5-Expression signifikant reguliert wurden. **(C)** Liste von ausgewählten Signalwegen, die bei erhöhter RGS5-Expression signifikant reguliert sind, basierend auf GSEA (weißer Hintergrund: stärker exprimiert, beiger Hintergrund: schwächer exprimiert). Aufgelistet sind ausgewählte Gene, deren differentielle Expression signifikante ( $p < 0,05$ ) Unterschiede zeigten (HUGENE® 2.0 Arraysonden, Affymetrix,  $n=3$ ) (s.5.2.2.5).

### 6.1.3 Analyse des Einflusses von RGS5 auf Markerproteine des kontraktile Phänotyps

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen im Transkriptom der GMZ auch entsprechende Anpassungen im Proteom zur Folge haben, wurden exemplarisch die Mengen von SM-MHC und Calponin mittels Western Blot-Analyse in Gesamtzelllysaten aus HUASMCs nach RGS5 Überexpression untersucht.



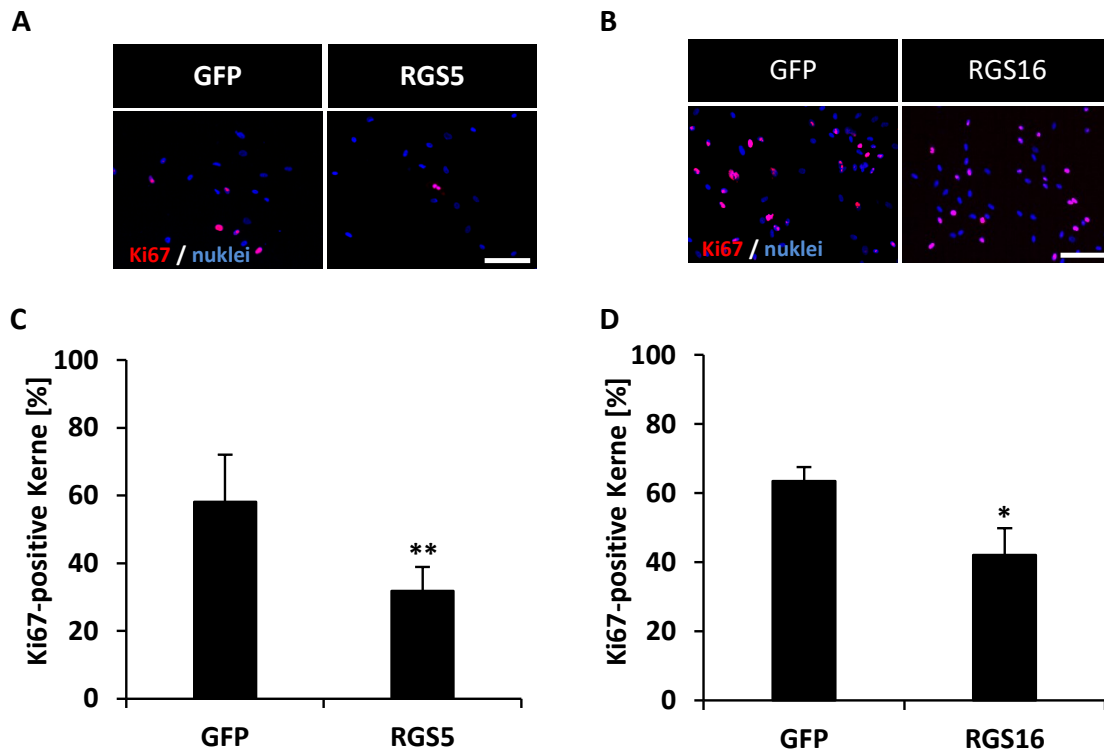
**Abbildung 16 Analyse des Einflusses von RGS5 auf das Vorkommen von Kontraktionsmarkerproteinen. (A, B)** Nach Adenovirus-Vektor-induzierter GFP-Überexpression (Kontrolle) bzw. RGS5-Überexpression (nach 24 Stunden) wurde die Menge von SM-MHC und Calponin im Gesamtzelllysate mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren ermittelt. Als Referenzprotein zum Gesamtproteinauftrag wurde  $\alpha$ -Tubulin eingesetzt. Die Grauintensität der jeweiligen Proteine wurde jeweils zu  $\alpha$ -Tubulin ins Verhältnis gesetzt und auf die Kontrolle (GFP) normalisiert (nicht signifikant (n.s.), GFP vs. RGS5 (SM-MHC),  $**p \leq 0,01$  GFP vs. RGS5 (Calponin),  $n=4$ ).

Dabei zeigte sich, dass die Menge an SM-MHC im Gesamtzelllysate durch die RGS5-Überexpression nicht verändert wird, während die Calponin-Menge signifikant ansteigt (Abbildung 16).

## 6.2 Der Einfluss von RGS5 und RGS16 auf die Funktion glatter Gefäßmuskelzellen

Die Transkriptomanalyse mittels Mikroarray-Technologie ergab eine verringerte Expression von Genen, die den Zellzyklus und die Zellteilung initiieren, darunter auch *mki67*. Um diesen Befund zu validieren, wurden HUASMCs mit RGS5, RGS16 bzw. (als Kontrolle) GFP-überexprimierenden adenoviralen Vektoren transduziert. Dieses Vorgehen diente dazu, die Spezifität RGS5-vermittelter Effekte beurteilen zu können.

Die Proliferation wurde anhand der Lokalisierung von Ki-67 im Zellkern mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Dabei zeigte sich sowohl nach RGS5- (Abbildung 17 A, C) als auch nach RGS16-Überexpression (Abbildung 17 B, D) eine signifikant geringere Anzahl Ki-67-positiver Zellkerne im Vergleich zu GFP-überexprimierenden HUASMCs.

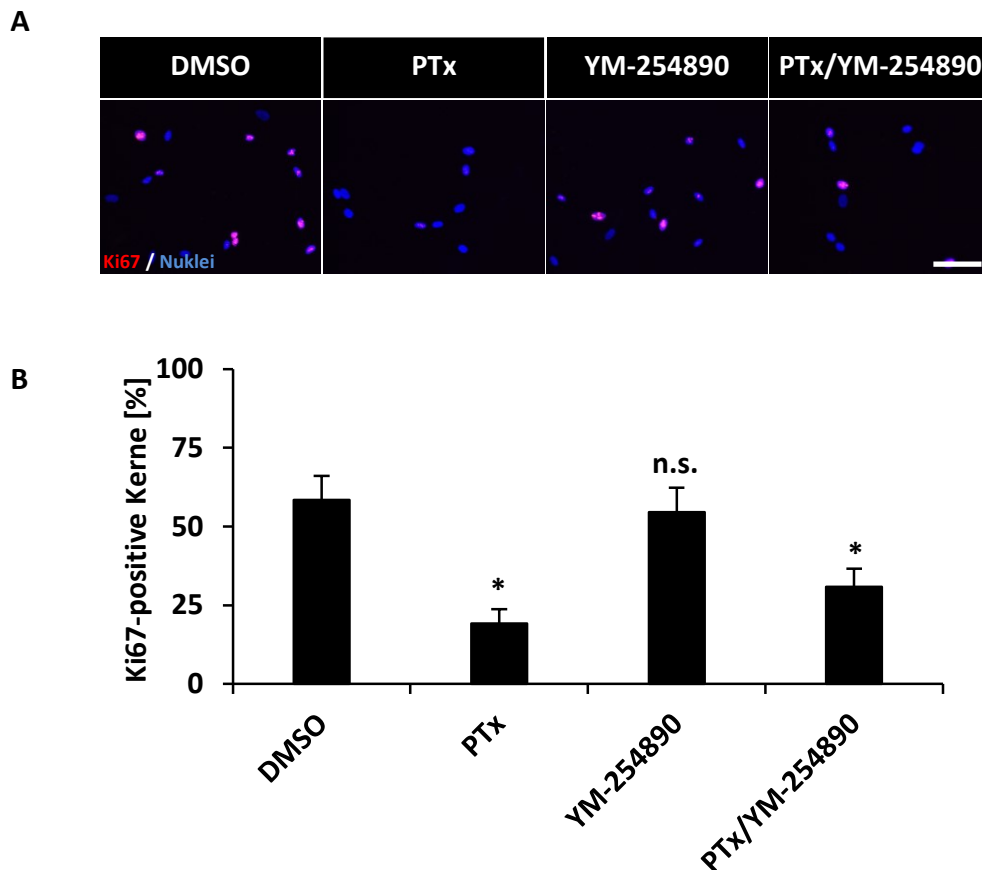


**Abbildung 17** Quantitative Analyse des Proliferationsmarkers Ki-67 nach RGS5- bzw. RGS16-Überexpression in HUASMCs. Nach adenoviral induzierter RGS5- (A, C) bzw. RGS16-Überexpression (B, D) (nach 24 Stunden) wurden HUASMCs fixiert und hinsichtlich der Proliferation mittels Ki-67-spezifischer Immunfluoreszenzfärbung (Olympus IX83) untersucht. Der prozentuale Anteil Ki-67-positiver Zellkerne (rote Fluoreszenz: Ki-67, blaue Fluoreszenz: DAPI, Maßbalken: 200  $\mu$ m) wurde anhand der ImageJ Software (1.49v) ermittelt und prozentual zur Gesamtzellzahl dargestellt. Gezeigt werden repräsentative Bilder (\*\* $p \leq 0,01$  GFP vs. RGS5,  $n=6$ , \* $p \leq 0,05$  GFP vs. RGS16,  $n=3$ ).

### 6.2.1 Vergleichende Untersuchung der Wirkung von $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{i/o}$ auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

Die Tatsache, dass RGS16 trotz höherer Abundanz gegenüber RGS5 einen geringeren Einfluss auf die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung (s. 5.2.2.4) und Proliferation von GMZ nimmt, wirft die Frage auf, ob dies gegebenenfalls an der unterschiedlich starken Beeinflussung der Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheiten  $G\alpha_{q/11}$  und  $G\alpha_{i/o}$  liegt. Um zu überprüfen, welcher der Signalwege für die Proliferation relevant ist, wurden beide separat oder parallel gehemmt (s. 5.2.2.8 & 5.2.2.9). Um die Proliferation der GMZ in Abhängigkeit beider  $G\alpha$ -Untereinheiten zu analysieren, wurden HUASMCs 24 Stunden in Gegenwart von PTx und YM-254890 kultiviert. Anschließend erfolgte die Detektion von Ki-67 im Zellkern. Dabei zeigte sich eine signifikant verminderte Anzahl Ki-67-positiver Zellkerne nach PTx-Behandlung, während die Inhibition des  $G\alpha_{q/11}$ -Signalwegs durch YM-254890 keinen Effekt hatte (Abbildung 18). Die

Kombination beider Inhibitoren führte im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen ebenfalls zu einer signifikanten Ki-67-Immunfluoreszenz im Zellkern.

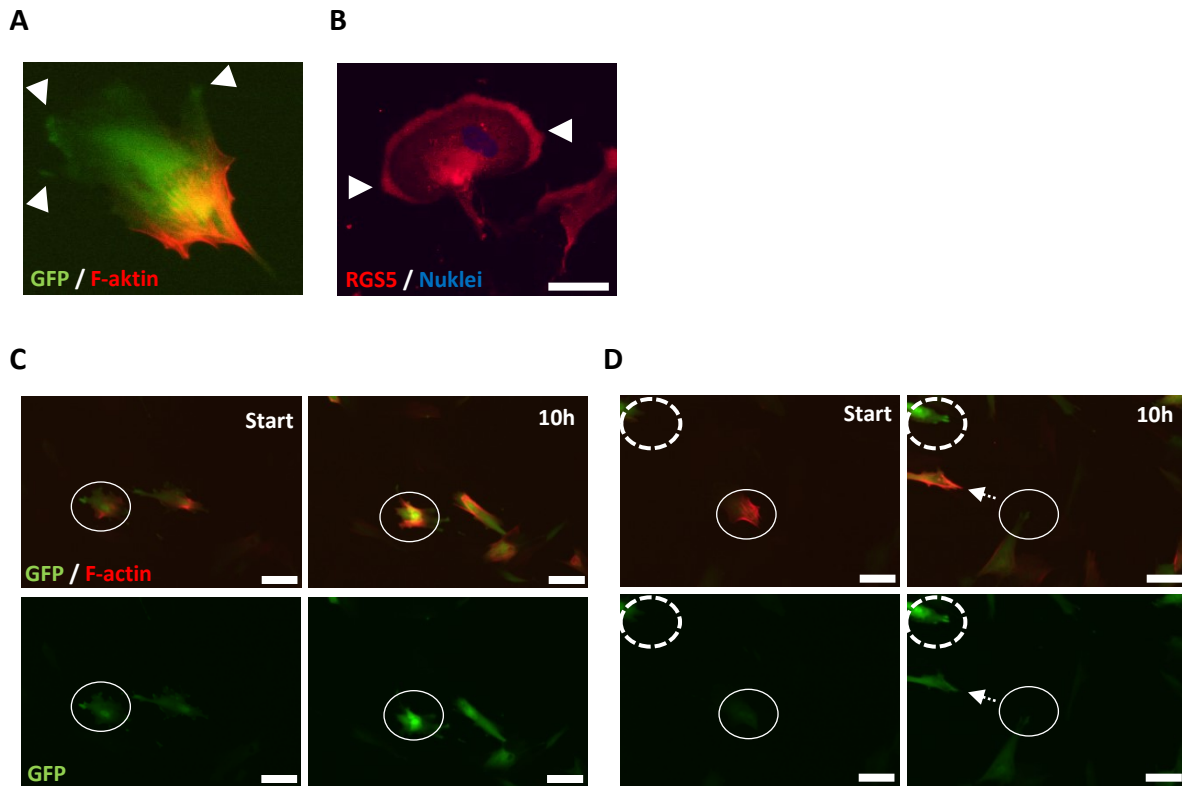


**Abbildung 18 Quantitative und qualitative Analyse Ki-67-positiver Zellkerne nach PTx- bzw. YM-254890-Behandlung in HUASMCs.** (A) HUASMCs wurden nach PTx- (200 ng/ml) und YM-254890 (2  $\mu$ M)-Behandlung (nach 24 Stunden) fixiert und 5 Gesichtsfelder pro Plattenvertiefung mittels Ki-67-spezifischer Immunfluoreszenzfärbung (Olympus IX83) aufgenommen. Dargestellt werden exemplarische Aufnahmen. (B) Der prozentuale Anteil an Ki-67-positiven Zellkernen (rote Fluoreszenz: Ki-67, blaue Fluoreszenz: DAPI, Maßbalken: 100  $\mu$ m) wurde anhand der ImageJ Software (1.49v) ermittelt und prozentual zur Gesamtzellzahl dargestellt. Gezeigt werden ausgewählte, repräsentative Bilder (nicht signifikant (n.s.), DMSO vs. YM-254890, \* $p \leq 0,05$  DMSO vs. YM-254890+PTx, \* $p \leq 0,05$  DMSO vs. PTx,  $n=3$ ).

### 6.2.2 Analyse des Migrationsverhaltens glatter Gefäßmuskelzellen nach RGS5 Überexpression

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von RGS5 auf die Migration der HUASMCs überprüft. In initialen Versuchen wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen festgestellt, dass die RGS5-spezifische Fluoreszenz in migrierenden Zellen zum Teil in den Protrusionen lokalisiert ist (Abbildung 19 A und B, weiße Pfeile). Um daran anknüpfend den Einfluss von RGS5 auf die Migrationsdynamik über die Zeit genauer zu untersuchen, wurde hierzu RGS5 in den GMZ überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen mittels *Life Cell Imaging* (s. 5.2.1.7) beobachtet. Dabei wurde deutlich, dass die Zellen, die RGS5 überexprimieren (identifiziert anhand der GFP-Fluoreszenz; Abbildung 19 C, weißer Kreis, D,

gestrichelter Kreis) im Vergleich zu schwach RGS5-überexprimierenden Zellen (Abbildung 19 D, Pfeil) kaum migrieren.

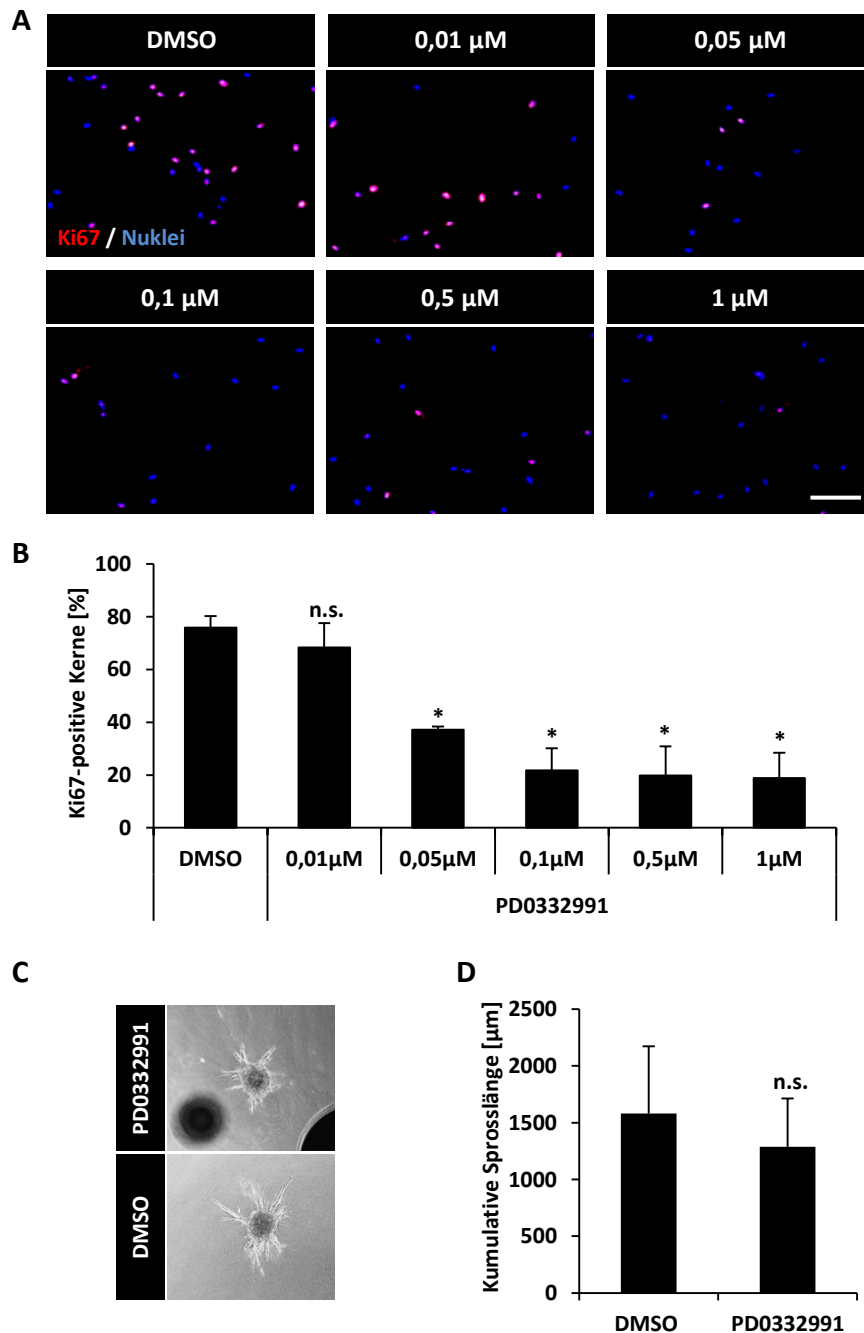


**Abbildung 19 Beobachtung des Migrationsverhaltens von HUASMCs in Abhängigkeit von RGS5.** (A) HUASMCs wurden adenoviral transduziert (RGS5 und LifeAct (MOI 100)) (24 Stunden) und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Lebendzellmikroskopie, grüne Fluoreszenz: GFP, rote Fluoreszenz: RFP, visualisiert F-Aktin, Maßbalken: 50 µm). (B) RGS5-Detektion in HUASMCs mittels Immunfluoreszenzfärbung (rote Fluoreszenz: RGS5, blaue Fluoreszenz: DAPI). (C, D) HUASMCs wurden 4 Stunden mit einem Adenovirus-Vektor transduziert (GFP, RGS5) und die Migration einzelner Zellen (C, D, weißer Kreis, D, gestrichelter Pfeil) anschließend 10 Stunden mittels Fluoreszenzmikroskopie (grüne Fluoreszenz: GFP, rote Fluoreszenz: RFP) aufgenommen (Maßbalken: 100 µm).

### 6.2.3 Vergleichende Untersuchung der Effekte von RGS5 und RGS16 auf die Migration glatter Gefäßmuskelzellen

Die zuvor beobachtete Motilität von RGS5-überexprimierenden HUASMCs, gekoppelt an die zunehmende GFP-spezifische Fluoreszenzintensität, gibt einen initialen Hinweis auf eine gehemmte Motilität der Zellen in Abhängigkeit der RGS5-Menge. Um dies genauer zu untersuchen und gegenüber RGS16 abzugrenzen, sollte nun die Migration basierend auf einem Kollagengel-Migrationsassays untersucht werden. Um ausschließen zu können, dass die so erhaltenen Resultate durch die Proliferation der Zellen verfälscht werden, wurden die HUASMCs in einem Vorversuch 24 Stunden lang mit dem selektiven CDK4/6 Hemmer PD0332991 behandelt. Anschließend wurde die Proliferation der Zellen

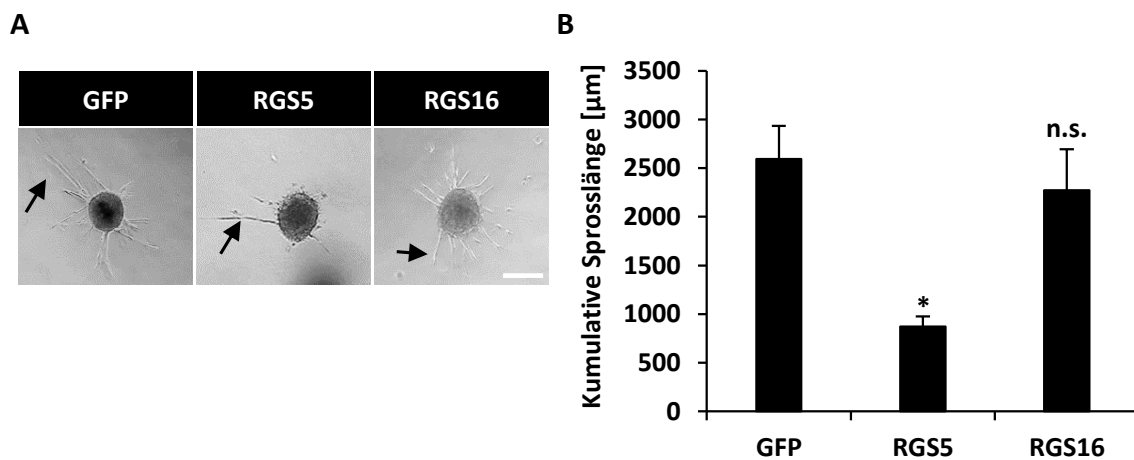
durch die Anzahl Ki-67-positiver Kerne bestimmt (Abbildung 20 A, B). Nach einer Konzentrationsbestimmung wurde die Arbeitskonzentration von PD0332991 mit 0,1  $\mu\text{M}$  für die weiteren Versuche festgelegt. Im anschließenden Gel-Migrationsassay zeigte der Einsatz des Inhibitors



**Abbildung 20 Untersuchung des Einflusses der Proliferation auf die Migration von HUASMCs in ein Kollagengel. (A, B)** HUASMCs wurden nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von PD0332991 (24 Stunden) fixiert und hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens mittels Ki-67-spezifischer Immunfluoreszenzfärbung (Olympus IX83) untersucht. Der prozentuale Anteil Ki-67-positiver Zellkerne (rote Fluoreszenz: Ki-67, blaue Fluoreszenz: DAPI) wurde anhand der ImageJ Software (1.49v) ermittelt und prozentual zur Gesamtzellzahl dargestellt (\* $p \leq 0,05$  DMSO vs. 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  PD0332991, nicht signifikant (n.s.), DMSO vs. 0,001  $\mu\text{M}$ ,  $n=3$  Maßbalken: 200  $\mu\text{m}$ ). **(C, D)** Nach Sphäroidformung über Nacht wurden HUASMC-Sphäroide in Kollagengele eingebettet und für weitere 24 Stunden mit PD0332991 (0,1  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Es wurde nach 24 Stunden die kumulative Länge der Sprossungen in  $\mu\text{m}$  ermittelt (nicht signifikant (n.s.), DMSO vs. PD0332991,  $n=4$ , Maßbalken: 200  $\mu\text{m}$ ).

keinen signifikanten Effekt auf das Migrationsverhalten der Zellen in das Kollagengel (Abbildung 20 C, D). Demnach zeigt dieser experimentelle Ansatz, dass die Migration der GMZ nicht durch ihre Proliferation beeinflusst wird.

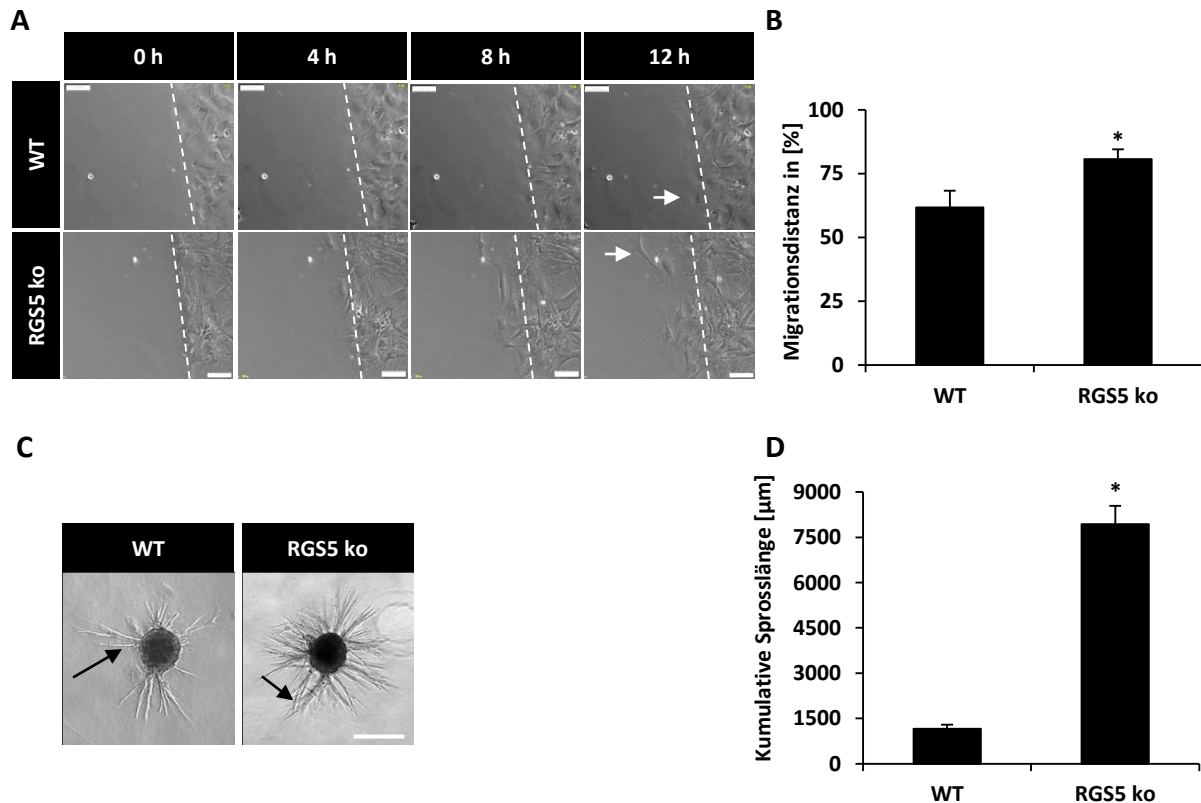
Um eine vergleichende Aussage zur Wirkung von RGS5 und RGS16 auf das Migrationsverhalten der HUASMCs treffen zu können, wurde die Migration von RGS5- bzw. RGS16-überexprimierenden Zellen aus Sphäroiden in Kollagengelen quantifiziert. Dabei zeigte sich eine signifikant reduzierte kumulative Sprossenlänge nach RGS5-Überexpression. Die Überexpression von RGS16 hatte dagegen keinen Einfluss auf die 3D-Migration der GMZ (Abbildung 21).



**Abbildung 21 Untersuchung der Migration von HUASMCs in ein Kollagengel nach RGS5- bzw. RGS16-Überexpression. (A, B)** Nach adenoviral induzierter RGS5- bzw. RGS16-Überexpression (24 Stunden) wurden über Nacht HUASMC-Sphäroide geformt und anschließend in Kollagengele eingebettet. Die kumulative Länge der Sprossen (schwarze Pfeile) wurde nach 24 Stunden in µm ermittelt (nicht signifikant (n.s.), GFP vs. RGS16, \* $p \leq 0,05$ , GFP vs. RGS5,  $n=3$ , Maßbalken: 200 µm).

#### 6.2.4 Untersuchung des Migrationsverhaltens RGS5-defizienter glatter Gefäßmuskelzellen in Kollagengelen

Um die Relevanz des oben gezeigten Ergebnisses nachzuweisen, wurde überprüft, ob das Fehlen von RGS5 umgekehrt zu einer verstärkten Migration führen kann. In einem ersten Versuch wurde die laterale Migration (s. 5.2.2.3) von RGS5-defizienten murinen GMZ aus der Linie *rgs5*<sup>GFP/GFP95</sup> (RGS5 ko) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf dem C57BL/6-Hintergrund untersucht. Dabei wurde erfasst, ob und wie schnell kultivierte GMZ auf ein freies Areal migrieren können. Hierbei zeigten die einzelnen Zeitpunkte in Abbildung 22 A und B bereits nach acht Stunden signifikant mehr RGS5-defiziente Zellen innerhalb des zuvor unbesiedelten Spalts im Vergleich zu Zellen aus Wildtyp-Mäusen (WT). Gleichzeitig erzielten die aus den Sphäroiden migrierenden Zellen im Gel-Migrationsassay eine signifikant höhere kumulative Sprossenlänge (Abbildung 22 C, D).

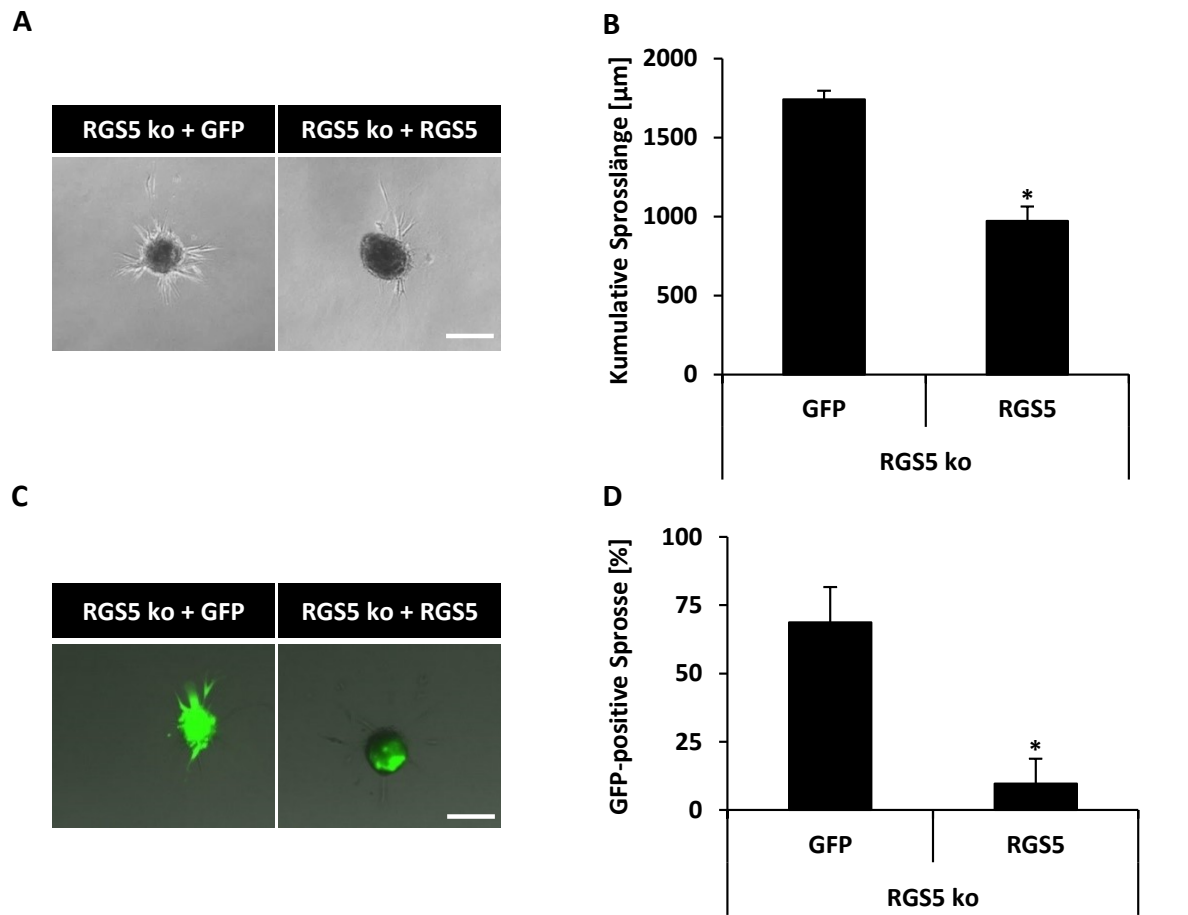


**Abbildung 22 Untersuchung des Migrationsverhaltens RGS5-defizienter glatter Maus-Gefäßmuskelzellen. (A, B)** Das Migrationsverhalten von RGS5-defizienten (RGS5 ko) Maus-Gefäßmuskelzellen im Vergleich zu WT Zellen wurde nach Entfernen von Silikonbarrieren nach 0 Stunden, 4 Stunden, 8 Stunden und 12 Stunden gemessen und hinsichtlich der Migration auf das durch die Barriere zellfreien Areal analysiert (A, \* $p \leq 0,05$ , WT. vs RGS5 ko,  $n=3$ , Maßbalken: 100 µm). Die Migration der HUASMCs (weiße Pfeile) wurde in Bezug auf die Distanz der Zellfronten prozentual angegeben. **(C, D)** Zusätzlich wurde die Migration der RGS5-defizienten Maus-Gefäßmuskelzellen in ein Kollagengel im Vergleich zu Gefäßmuskelzellen aus Wildtyp-Mäusen untersucht. Die kumulative Länge der Sprossen (schwarze Pfeile) wurde nach 24 Stunden in µm ermittelt (\* $p \leq 0,05$ , GFP vs. RGS5 ko,  $n=3$ , Maßbalken: 200 µm).

### 6.2.5 Betrachtung des Migrationsverhaltens RGS5-defizienter glatter Gefäßmuskelzellen nach RGS5-Expressionsinduktion

Da die RGS5-Überexpression zu geringerer Migration und die RGS5-Defizienz zu verstärkter Migration führte, sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob eine RGS5-Reexpression in Sphäroiden aus RGS5-defizienten murinen GMZ ebenfalls zu einer Verminderung der Sprossung führt. Die Untersuchungen zeigten hierbei, dass RGS5-reexprimierende Zellen tatsächlich signifikant weniger in das Kollagengel einwanderten im Vergleich zu RGS5-defizienten Kontrollzellen (Abbildung 23 A). Dabei zeigte sich außerdem, dass RGS5-exprimierende, grün fluoreszierende Zellen kaum Sprossen im Kollagengel aufweisen (Abbildung 23 B).



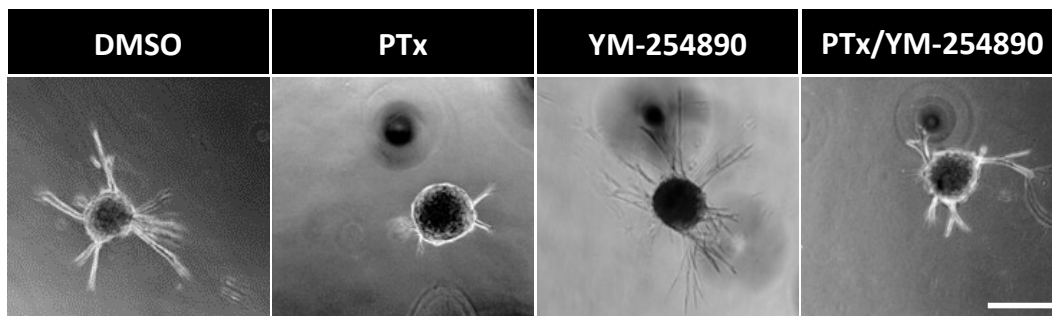


**Abbildung 23 Untersuchung des Migrationsverhaltens RGS5-defizienter glatter Maus-Gefäßmuskelzellen nach RGS5-Reexpression.** (A, B) In RGS5-defizienten glatten Maus-Gefäßmuskelzellen wurde durch die Transduktion mit Adenovirus-Vektoren RGS5 exprimiert (24 Stunden). Aus diesen Zellen wurden über Nacht Sphäroide geformt und diese in ein Kollagengel eingebettet. Die kumulative Länge der Sprosse wurde nach 24 Stunden in  $\mu\text{m}$  ermittelt (\* $p \leq 0,05$ , GFP/RGS5 ko vs. RGS5/RGS5 ko,  $n=3$ ). (C, D) Zusätzlich erfolgte die prozentuale Angabe der GFP-positiven Sprosse in Bezug auf nicht-fluoreszierende Sprosse, die in das Gel ausgewachsen sind (B, \* $p \leq 0,05$ , GFP vs RGS5/GFP,  $n=3$ , Maßbalken: 200  $\mu\text{m}$ ).

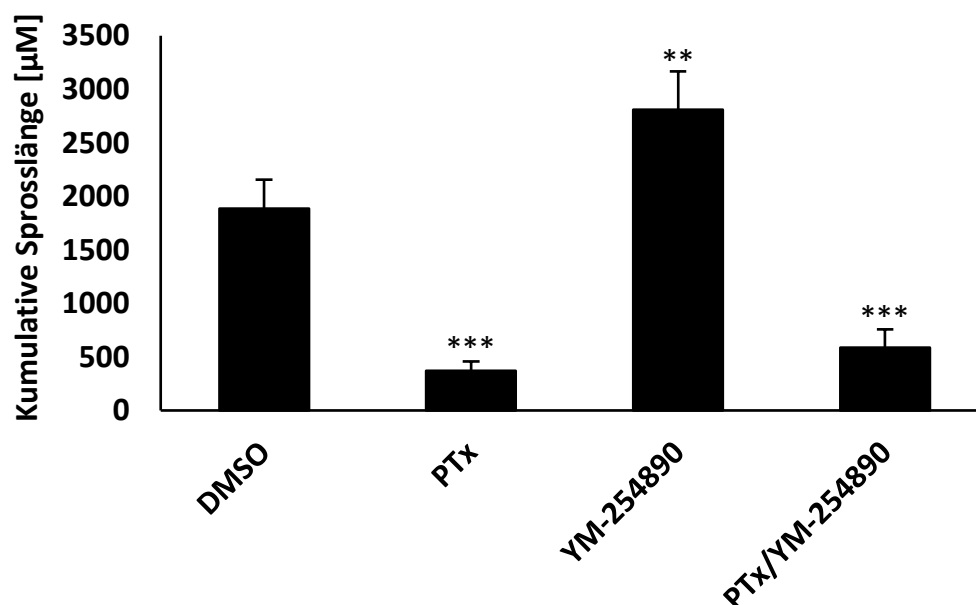
### 6.2.6 Untersuchung der $\text{G}\alpha_{q/11}$ - bzw. $\text{G}\alpha_{i/o}$ -abhängigen Migration glatter Gefäßmuskelzellen

Um die Bedeutung der durch RGS5 inhibierten Signalwege für die beobachteten Effekte auf die Migration der GMZ zu untersuchen, wurden HUASMCs bereits während der Sphäroidformung mit den Inhibitoren PTx und YM-254890 behandelt. Abbildung 24 zeigte die signifikante Reduktion in der Migration der HUASMCs anhand reduzierter kumulativer Sprosslängen nach der Hemmung des  $\text{G}\alpha_{i/o}$ -Signalweges durch die Behandlung mit PTx. Die Hemmung des  $\text{G}\alpha_{q/11}$ -Signalweges mündete dabei in eine signifikant erhöhte Migration.

A



B



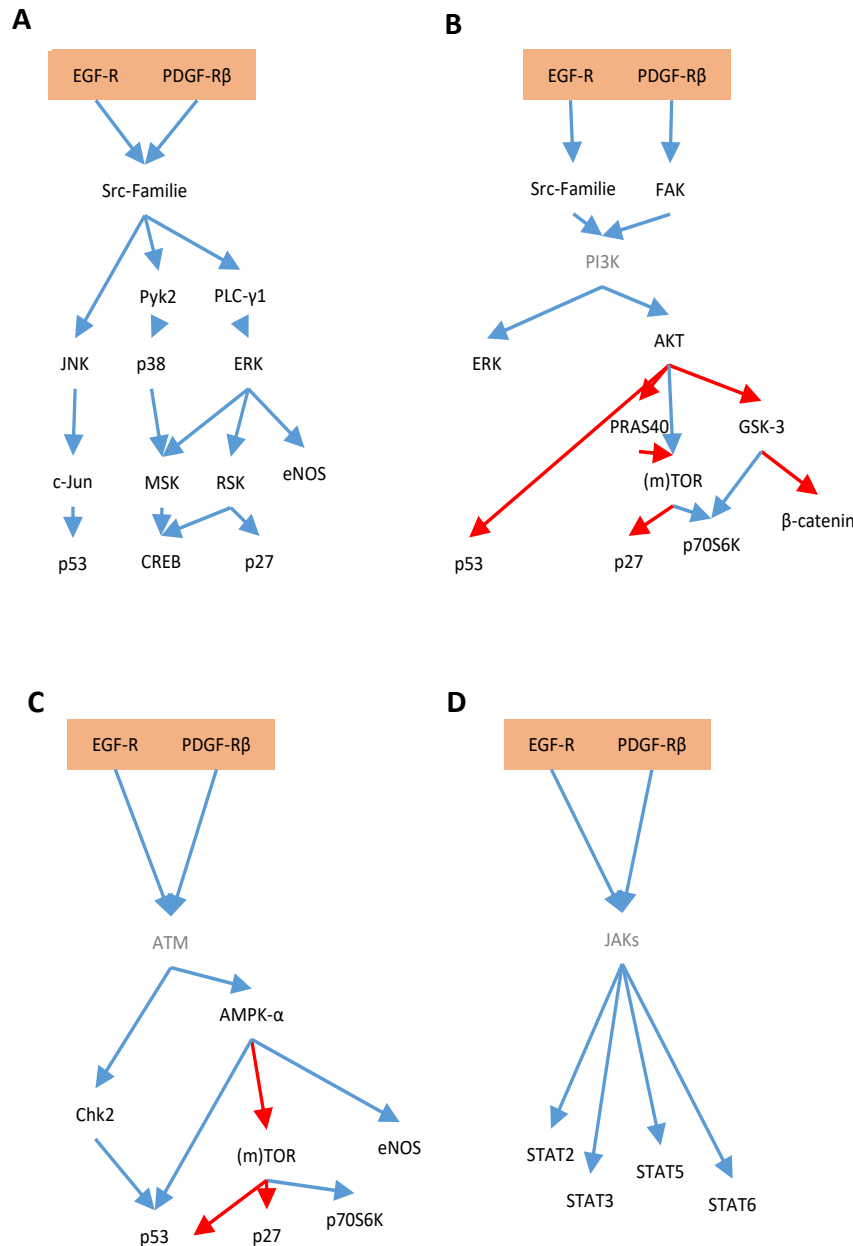
**Abbildung 24 Untersuchung der Migration von HUASMCs in ein Kollagengel nach Behandlung mit PTx bzw. YM-254890. (A, B)** Nach der Behandlung von HUASMCs mit PTx (200 ng/ml), YM-254890 (2 µM) oder einer Kombination aus beiden Substanzen (24 Stunden) wurden aus diesen Zellen über Nacht HUASMC-Sphäroide geformt und anschließend in Kollagengele eingebettet, die ebenfalls PTx und/oder YM-254890 beinhalten. Nach 24 Stunden wurde die kumulative Länge der Sprosse in µm ermittelt (\*\*p≤0,01, DMSO vs. YM-254890, \*\*\*p≤0,001, DMSO vs. PTx, PTx/YM-254890, n=4, Maßbalken: 200 µm).

### 6.3 Analyse der Effekte von RGS5 und RGS16 in Proliferations- und Migrationsrelevanten Signalkaskaden

#### 6.3.1 Analyse des Kinasen-Profiles nach RGS5- bzw. RGS16-Überexpression in glatten Gefäßmuskelzellen

Für G-Protein-abhängige Signalkaskaden sind Kinasen wichtige Effektorproteine. Um herauszufinden, ob die zuvor durch RGS5- bzw. RGS16-Überexpression beobachteten Effekte über die veränderte Phosphorylierung der Kinasen und der daraus resultierenden Unterschiede in der Kinasenaktivität zu erklären sind, wurde der Phosphorylierungsgrad verschiedener Kinasen mit Hilfe von Kinasen-Arrays

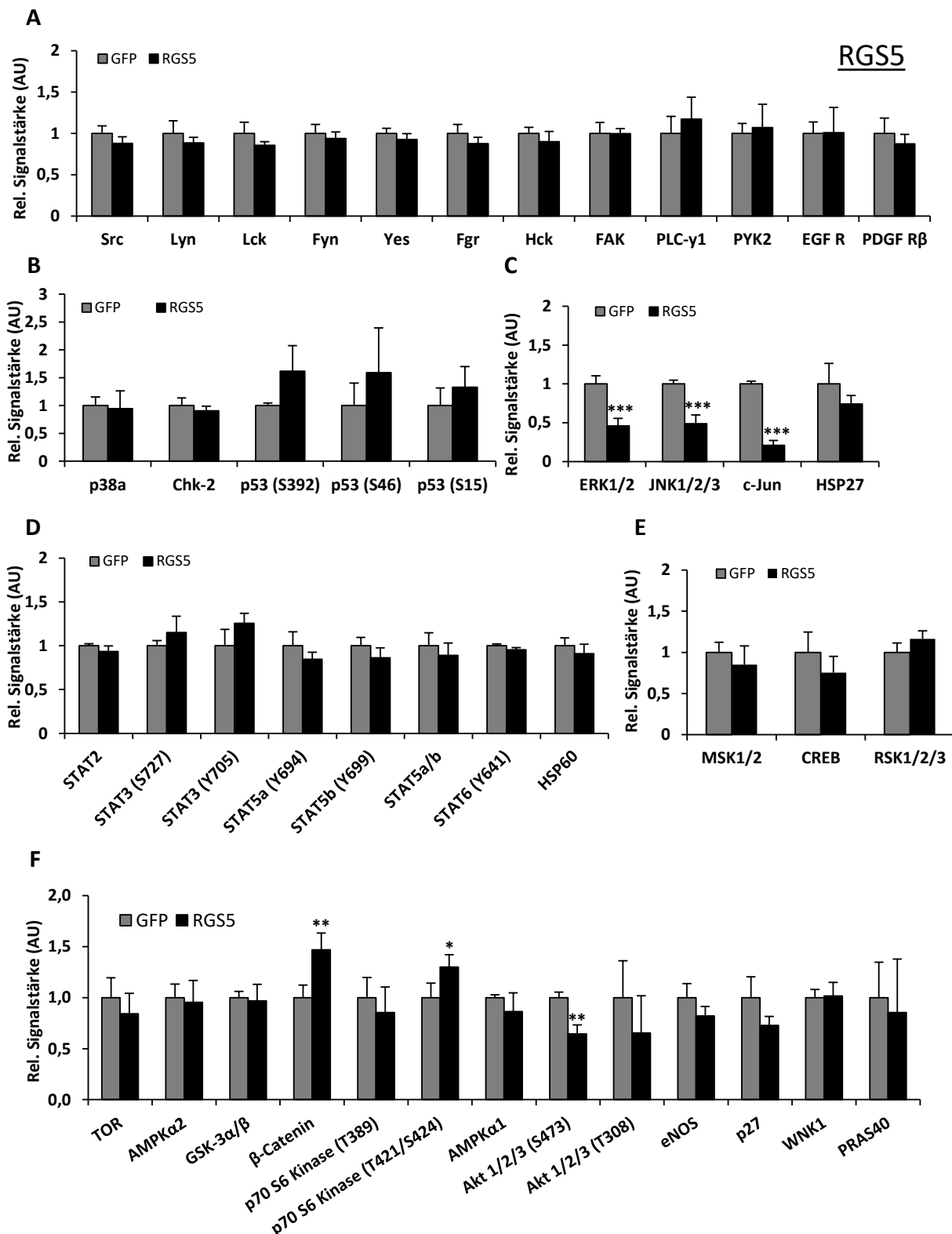
(s. 5.2.2.7) ermittelt. Die im Array verwendeten Kinasen wurden zur besseren Übersicht in einem Schaubild (Abbildung 25) in vier Signalwege zusammengefasst.



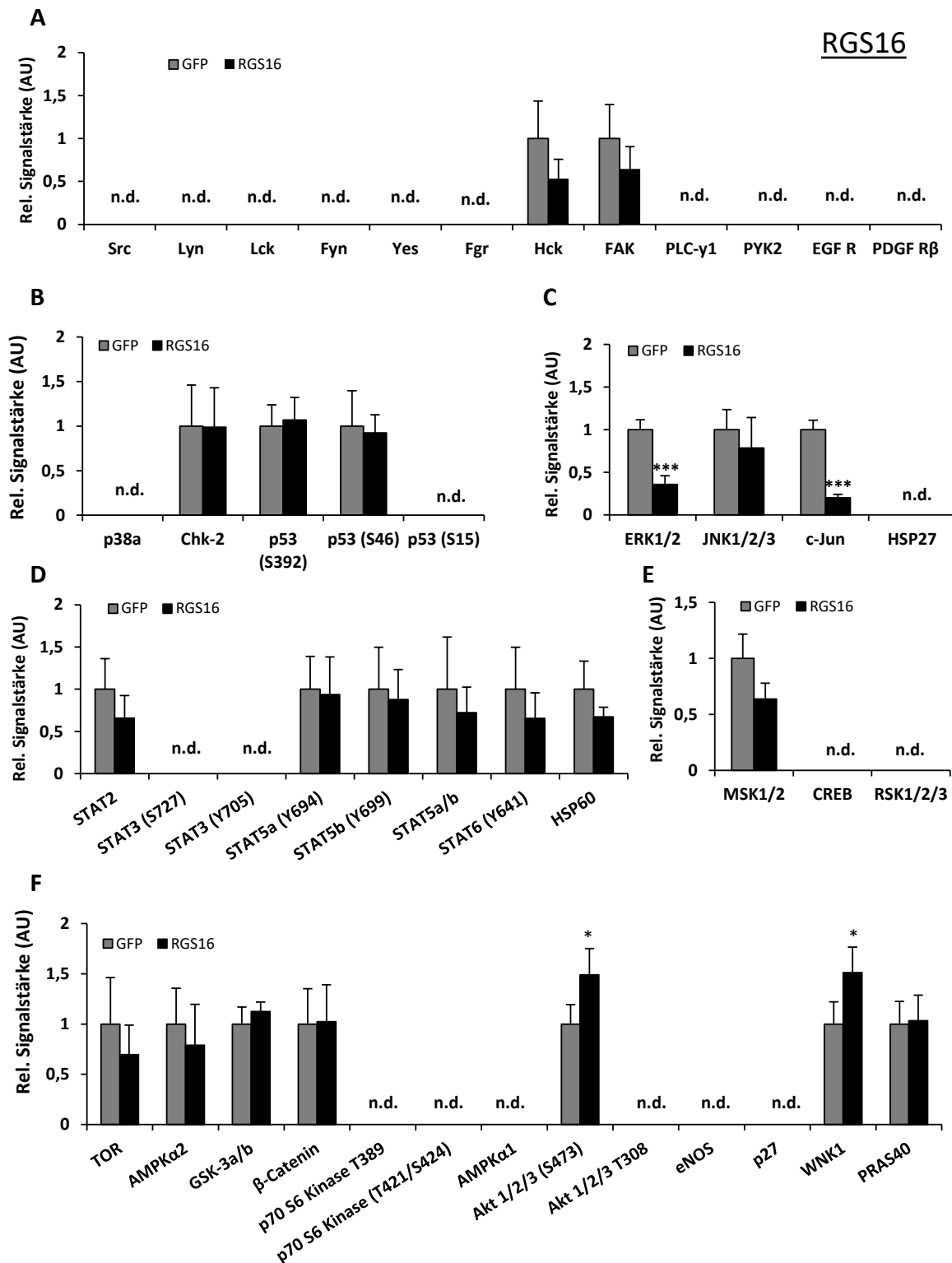
**Abbildung 25 Übersichtsdiagramm der Zusammenhänge der im Proteome Profiler® vorhandenen Proteinkinasen und deren Zielproteinen.** (A) Dargestellt sind die MAP-Kinasen JNK, p38, ERK und nachgeschaltete Effektorproteine oder MAPK-abhängige Zielproteine. Pyk2: *proline-rich tyrosine kinase 2*; PLC-γ1: *Phospholipase C-γ1*, eNOS: *endothelial nitric oxide synthase*, MSK: *mitogen- and stress-activated protein kinase*, RSK: *90 kDa ribosomal S6 kinase*, CREB: *cAMP response element-binding protein*, Src: *Proto-oncogene tyrosine-protein Kinases*. (B) Zusammengefasst wurde die Signalkaskade abhängig von PI3K und Akt. Wobei PI3K nicht im Array vorkommt, aber als übergeordnetes Effektorprotein des PI3K/Akt-Signalwegs dargestellt werden soll. FAK: *Focal adhesion kinase 1*, PRAS40: *Proline-rich Akt1 substrate 1*, GSK-3: *glycogen synthase kinase-3β*, (m)TOR: *Serine/threonine-protein kinase (m)TOR*, p70 S6 Kinase: *70 kDa ribosomal protein S6 kinase*. (C) Die ATM/AMPK-α folgenden Signalkaskaden zeigen einen alternativen Weg zur Regulation von (m)TOR, wobei ATM hier lediglich als übergeordnetes Protein für dessen Verbindung zu Chk2 erwähnt wird und nicht im Array vorkommt. ATM: *serine-protein kinase ATM*, AMPK-α: *AMP-activated protein kinase-alpha*, Chk2: *check point kinase 2*. (D) Dargestellt wurden die STAT-Proteine zusammengefasst als Zielproteine von JAKs als übergeordnete Effektormoleküle. STAT: *Signal transducer and activator of transcription*, JAKs: *Januskinasen*. (blaue Pfeile: positive Regulieren/Aktivierung durch Phosphorylierung, rote Pfeile: negative Regulierung/Inaktivierung durch Phosphorylierung, graue Schrift: Proteine, die nicht im Array vorkommen). Src-Kinasen (Src, Lyn, Lck, Fyn, Yes, Fgr, Hck), die im Array vorkommen, wurden zur besseren Übersicht unter dem Überbegriff Src-Familie zusammengefasst. Kasten (orange): EGF-R: *epidermal growth factor receptor*, PDGF-Rβ: *platelet-derived growth factor receptor beta*.

Nach der Array-Auswertung zeigte sich, dass RGS5 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der *proto-oncogene tyrosine-protein* Kinasen wie Src, Lyn, Lck, Fyn oder Yes hat (Abbildung 25 A). Es wurden weder die Zielproteine der Januskinase, die STAT-Proteine (Abbildung 25 D), noch Kinasen der RSK-Familie wie RSK1/2/3 und MSK1/2 signifikant unterschiedlich phosphoryliert (Abbildung 25 E). Der Array zeigte ebenfalls keine signifikante Differenz in der Phosphorylierung von p53 durch die Überexpression von RGS5 (Abbildung 25 B). RGS5 reduzierte allerdings signifikant die Phosphorylierung der Proteine, die am MAP-Kinasen-Signalweg beteiligt sind, wie ERK1/2, JNK1/2/3 sowie deren Zielprotein c-Jun (Abbildung 25 C), wodurch deren Aktivität abnimmt. Zudem zeigte der Array eine reduzierte Phosphorylierung von Akt1/2/3 am Serin 473, das dessen Aktivität einschränkt. Zusätzlich stieg die  $\beta$ -Catenin-Menge in der Zelle nach RGS5-Überexpression an. Gleichzeitig wurde die Phosphorylierung der p70 S6 Kinase verstärkt, die dadurch aktiviert wird (Abbildung 25 F).

Nach RGS16 Überexpression kann durch den Kinasen-Array keine Aussage zur Phosphorylierung der Src-Kinasen getroffen werden (Abbildung 26 A), während das Aktivitätsprofil der STAT-Proteine und der RSK Kinasen ebenfalls keine signifikanten Änderungen zeigte (Abbildung 26 D, E). Gleichzeitig führte eine Überexpression von RGS16 zu einer niedrigeren Phosphorylierung von ERK1/2 sowie c-Jun, während die Aktivität der JNK1/2/3 im Vergleich zur RGS5-Überexpression unverändert blieb (Abbildung 26 C). Akt1/2/3 wurde unter RGS16-Überexpression am Serin 473 stärker phosphoryliert, ebenso die Serin-/Threonin-Proteinkinase WNK1 (Abbildung 26 F). Damit weist eine Überexpression von RGS16 im Vergleich zu RGS5 einen deutlichen Unterschied in der Phosphorylierung der Kinasen auf.



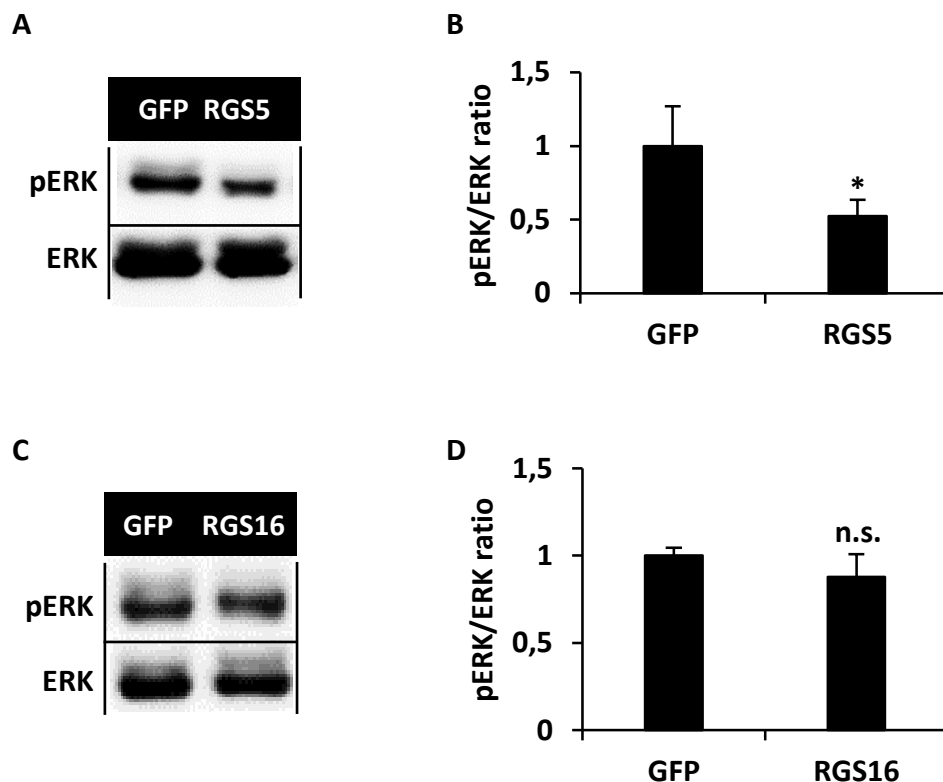
**Abbildung 26** Phosphorylierung unterschiedlicher Proteinkinasen nach RGS5-Überexpression in HUASMCs. RGS5 wurde in HUASMCs mithilfe von Adenoviren überexprimiert (24 Stunden) und die Phosphorylierung von Kinasen mittels Phosphokinasen-Proteomanalyse-Arrays (R&D Systems) untersucht. Dargestellt sind die mittleren relativen Grauwerte eines Experiments bezogen auf die mit Kontrollvirus (GFP) transduzierten Zellen (A – F, \* $p \leq 0,05$ , GFP (p70 S6 Kinase (T421/S424)), vs. RGS5 (p70 S6 Kinase (T421/S424)), \*\* $p \leq 0,01$  GFP (β-Catenin), (Akt1/2/3 (S473)) vs. RGS5 (β-Catenin), (Akt1/2/3 (S473)), \*\*\* $p \leq 0,001$ , GFP (ERK1/2), (JNK1/2/3), (c-Jun) vs. RGS5 (ERK1/2), (JNK1/2/3), (c-Jun),  $n=4$ ).



**Abbildung 27 Phosphorylierung unterschiedlicher Proteinkinasen nach RGS16-Überexpression in HUASMCs.** RGS16 wurde in HUASMCs mithilfe von Adenoviren überexprimiert (24 Stunden) und die Phosphorylierung von Kinasen mittels Phosphokinasen-Proteomanalyse-Arrays (R&D Systems) untersucht. Dargestellt sind die mittleren Grauwerte des experimentellen Ansatzes zur RGS5-Überexpression, normiert auf die mittleren Grauwerte des experimentellen Ansatzes mit Kontrollvirus (GFP)(A-F, nicht detektierbar (n.d.), \* $p \leq 0,05$ , GFP (Akt1/2/3 (S473)), (WNK1) vs. RGS16 (Akt1/2/3 (S473)), (WNK1), \*\*\* $p \leq 0,001$ , GFP (ERK1/2), (c-Jun) vs. RGS16 (ERK1/2), (c-Jun),  $n=4$ ).

### 6.3.2 Einfluss von RGS5 bzw. RGS16 auf die ERK1/2-Aktivität

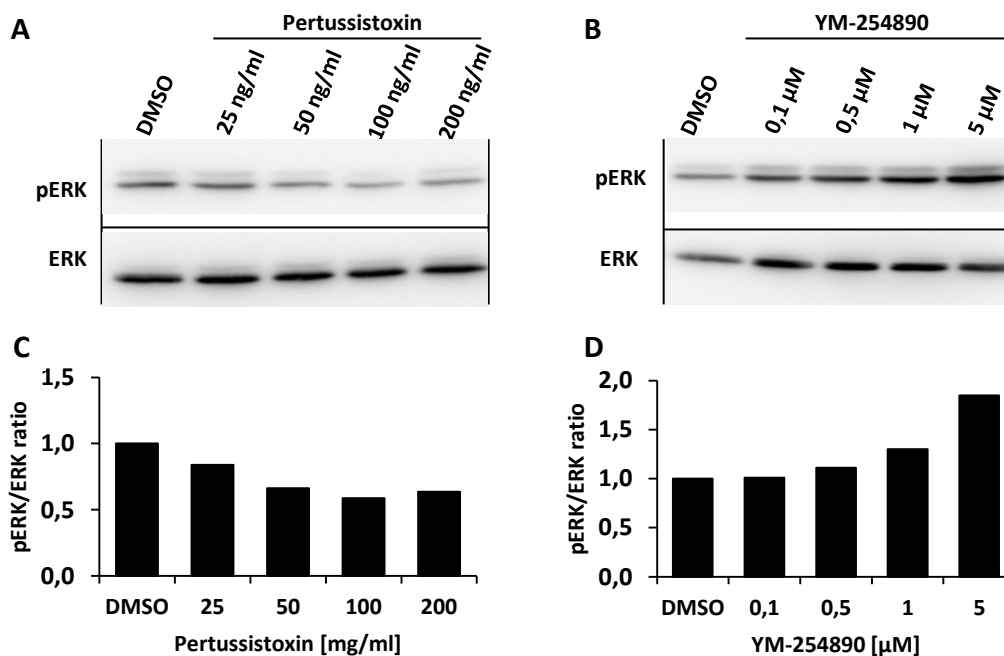
Die Kinasen-Analyse nach RGS5-Überexpression zeigte eine signifikant reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2, JNK1/2/3 und c-Jun nach RGS5-Überexpression. Die Überexpression von RGS16 hatte ebenso eine reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und c-Jun zur Folge. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurden Reste der Lysate, die für den RGS5 bzw. RGS16 Proteome Profiler genutzt wurden, eingesetzt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und erneut quantifiziert. Das Verhältnis von phosphoryliertem ERK1/2 zu unphosphoryliertem ERK1/2 bestätigt die im Array beobachtete Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung nach RGS5-Überexpression (Abbildung 28 A, B). Sie bestätigt dies allerdings nicht nach RGS16-Überexpression (Abbildung 28 C, D). Lediglich der Vergleich der Werte von phosphoryliertem ERK1/2 in GFP-überexprimierenden Zellen zu phosphoryliertem ERK1/2 in RGS5- bzw. RGS16-überexprimierenden Zellen im Western Blot bestätigen die in der Arrayauswertung erfasste Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 28 Untersuchung der ERK1/2-Aktivität in RGS5 überexprimierenden HUASMCs. (A, B)** Nach adenoviral induzierter RGS5- Überexpression bzw. **(C, D)** RGS16-Überexpression (24 Stunden) in HUASMCs, wurde die ERK1/2-Aktivierung mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren untersucht. Die Grauintensitäten der pERK1/2- und ERK1/2-spezifischen Banden wurden ins Verhältnis gesetzt und gegen die Grauwerte der Proben von adenoviral induzierten GFP-überexprimierenden Zellen normiert (\* $p \leq 0,05$ , GFP vs. RGS5,  $n=4$ , nicht signifikant (n.s.), GFP vs. RGS16,  $n=3$ ).

### 6.3.3 Untersuchung der ERK1/2-Aktivität in Abhängigkeit von $G\alpha_{q/11}$ bzw. $G\alpha_{i/o}$

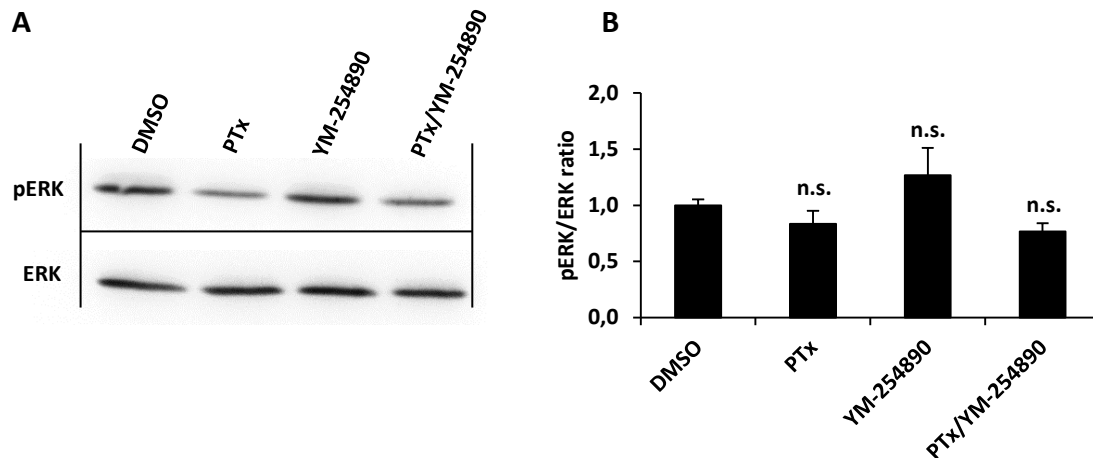
RGS5-Überexpression senkt den Aktivitätsgrad von ERK1/2 in GMZ. ERK1/2 ist sowohl in den  $G\alpha_{q/11}$ -abhängigen Signalweg als auch in den  $G\alpha_{i/o}$ -abhängigen Signalweg eingebunden, beide Signalwege werden durch RGS5 terminiert. Um einen Eindruck davon zu bekommen, welcher G-Protein-abhängige Signalweg in den kultivierten GMZ einen grundlegend hemmenden Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 hat, wurden die  $G\alpha$ -Untereinheiten  $G\alpha_{i/o}$  und  $G\alpha_{q/11}$  jeweils unabhängig voneinander konzentrationsabhängig gehemmt. Abbildung 29 A und C zeigte eine Tendenz zur konzentrationsabhängigen Verminderung der ERK1/2-Phosphorylierung (pERK) lediglich nach ansteigender PTx-Konzentration (Abbildung 29 B, D).



**Abbildung 29 Exemplarische Untersuchung der ERK1/2-Aktivität in PTx- bzw. YM-254890-behandelten HUASMCs.** (A, C) HUASMCs wurden 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen von PTx und (B, D) YM-254890 behandelt. Die Ermittlung der ERK1/2-Aktivierung erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren. Die Grauintensitäten der pERK1/2- und ERK1/2-spezifischen Banden wurden ins Verhältnis gesetzt und gegen die Grauwerte der DMSO-Behandlung normalisiert (n=1).

Weitere, quantitative Untersuchungen von HUASMCs mit inhibiertem  $G\alpha_{i/o}$ -,  $G\alpha_{q/11}$ - oder  $G\alpha_{i/o}/G\alpha_{q/11}$ -Signalweg zeigten unter basalen Bedingungen allerdings keine signifikant reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 bei Behandlung mit PTx, YM-254890 oder einer Kombination aus PTx und YM-254890 (Abbildung 30).

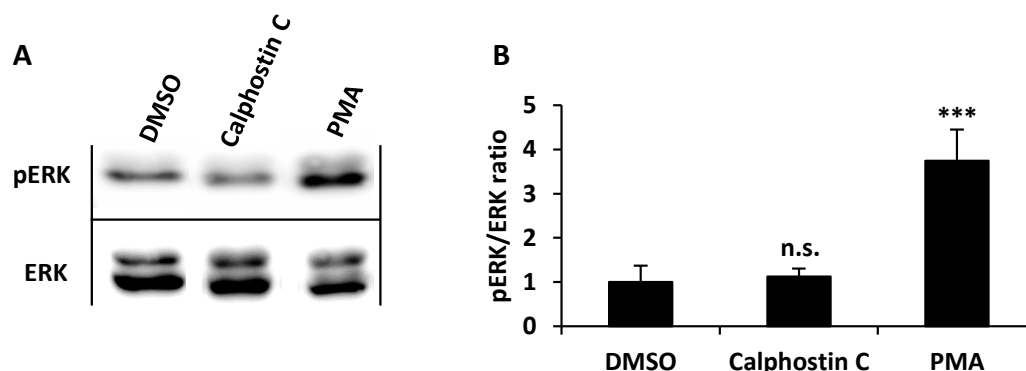




**Abbildung 30** Untersuchung der ERK1/2-Aktivität in PTx- bzw. YM-254890-behandelten HUASMCs. (A, B) HUASMCs wurden 24 Stunden mit PTx (200 ng/ml), YM-254890 (2  $\mu$ M) oder beiden Substanzen gleichzeitig behandelt. Die Ermittlung der ERK1/2-Phosphorylierung erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren. Die Grauintensitäten der pERK1/2- und ERK1/2-spezifischen Banden wurden ins Verhältnis gesetzt und gegen die Grauwerte der DMSO-Behandlung normalisiert (B, nicht signifikant (n.s.), DMSO vs. PTx, YM-254890, PTx/YM-254890, ANOVA,  $n=4$ ).

### 6.3.4 Untersuchung der ERK1/2-Aktivität in Abhängigkeit von PKC

Die zuvor gezeigten Ergebnisse geben kein eindeutiges Bild inwieweit in kultivierten HUASMCs die ERK-Aktivität über die beiden untersuchten G-Protein-Signalkaskaden beeinflusst wird. Um eine Beteiligung der durch diese Signalwege regulierten Proteinkinasen PKA und PKC zu verifizieren bzw. zu falsifizieren, wurden Hemmstoffe bzw. Stimulatoren der beiden Proteinkinasen eingesetzt. Dazu wurden HUASMCs zunächst mit dem PKC-Inhibitor Calphostin C behandelt. Dabei zeigte sich in nicht-stimulierten HUASMCs kein Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 31 B). Die Behandlung der HUASMCs mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), dem Strukturanalogon von Diacylglycerin und

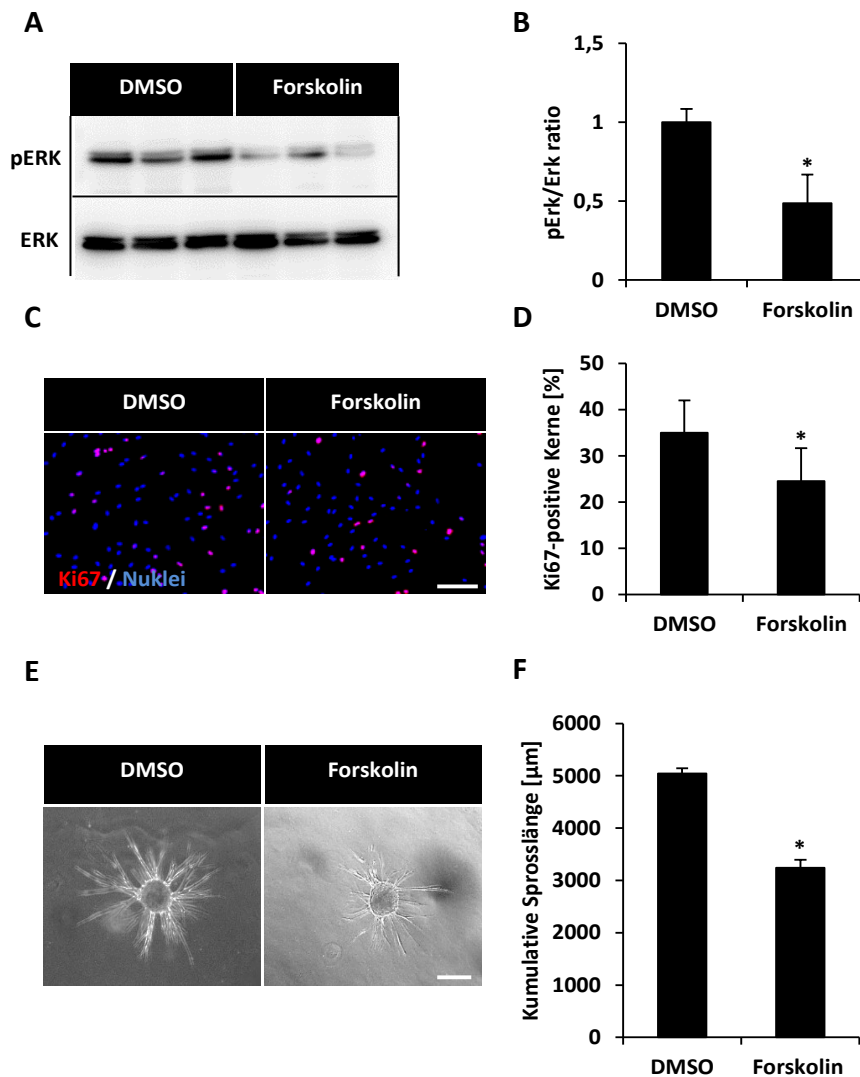


**Abbildung 31** Analyse der ERK1/2-Aktivität in HUASMCs nach Calphostin C- und PMA-Behandlung. (A, B) HUASMCs wurden vier Stunden mit Calphostin C (0,5  $\mu$ M) bzw. 24 Stunden mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (1  $\mu$ M) behandelt. Die Bestimmung der ERK1/2-Aktivierung erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren. Die Grauintensitäten der pERK1/2- und ERK1/2-spezifischen Banden wurden ins Verhältnis gesetzt und gegen die Grauwerte der DMSO-Behandlung normalisiert (B, nicht signifikant (n.s.), DMSO vs. Calphostin C, \*\*\* $p \leq 0,001$ , DMSO vs. PMA,  $n=4$ ).

damit Aktivator der PKC, führte dagegen zu einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung von ERK1/2.

#### 6.3.5 Effekte von PKA auf die ERK1/2-Aktivität, Proliferation und Migration in glatten Gefäßmuskelzellen

Da eine Hemmung der  $G\alpha_{q/11}$ /PKC-Signalachse die RGS5-vermittelten Effekte nicht kopiert, wurde nun untersucht, ob die Enthemmung der PKA-Aktivität nach Blockade der  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivität eine entsprechende Wirkung zeigt. Dazu wurden HUASMCs mit Forskolin, einem direkten Stimulator der Adenylatzyklase, behandelt. Abbildung 32 A und B zeigte eine signifikante Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung. Die Behandlung der HUASMCs mit Forskolin führte zudem zu einer Proliferationsreduktion (Abbildung 32 C, D). Die Behandlung von Sphäroiden mit Forskolin zeigte außerdem eine signifikant reduzierte 3D-Migration der GMZ (Abbildung 32 E, F).



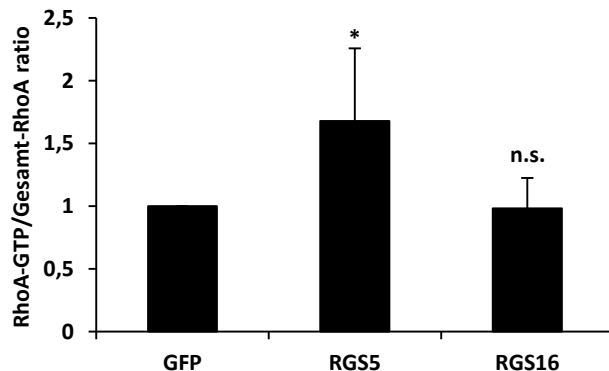
**Abbildung 32 Auswirkungen von Forskolin auf die ERK1/2-Aktivität, Proliferation und Migration von HUASMCs.** (A, B) HUASMCs wurden mit Forskolin behandelt (24 Stunden) und anschließend lysiert. Die Bestimmung der ERK1/2-Aktivierung erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren. Die Grauintensitäten der pERK1/2- und ERK1/2-spezifischen Banden wurden ins Verhältnis gesetzt und gegen die Grauwerte der DMSO-Behandlung normalisiert. (C, D) Zusätzlich wurden Zellen nach Behandlung mit Forskolin (24 Stunden) fixiert und hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens mittels Ki-67-spezifischer Immunfluoreszenzfärbung (Olympus IX83) untersucht. Der prozentuale Anteil Ki-67-positiver Zellkerne (rote Fluoreszenz: Ki-67, blaue Fluoreszenz: DAPI) wurde durch die ImageJ Software (1.49v) ermittelt. (E, F) Um das Migrationsverhalten der HUASMCs unter Forskolin-Einwirkung zu ermitteln, wurden die Zellen mit Forskolin während der Sphäroidformung behandelt (24 Stunden), anschließend in Kollagengele eingebettet und weitere 24 Stunden mit Forskolin behandelt. Anschließend erfolgte die Ermittlung der kumulativen Länge der Sprosse in µm (D, E, \* $p \leq 0,05$ , DMSO vs. Forskolin,  $n=3$ , Maßbalken: 200 µm, F, \* $p \leq 0,05$ , DMSO vs. Forskolin,  $n=3$ ).

## 6.4 Untersuchung der Rolle von RhoA-GTP in glatten Gefäßmuskelzellen

### 6.4.1 Ermittlung des Einflusses der RGS5-Überexpression auf die RhoA-GTP Menge und Stressfaserbildung

Um herauszufinden, ob RGS5 oder RGS16 einen vergleichbaren Einfluss auf die RhoA-Aktivierung haben, wurde die Menge an GTP-RhoA nach adenoviral induzierter RGS5- bzw. RGS16-Überexpression in HUASMCs bestimmt. Während eine RGS16-Überexpression die Menge an RhoA-GTP nicht signifikant

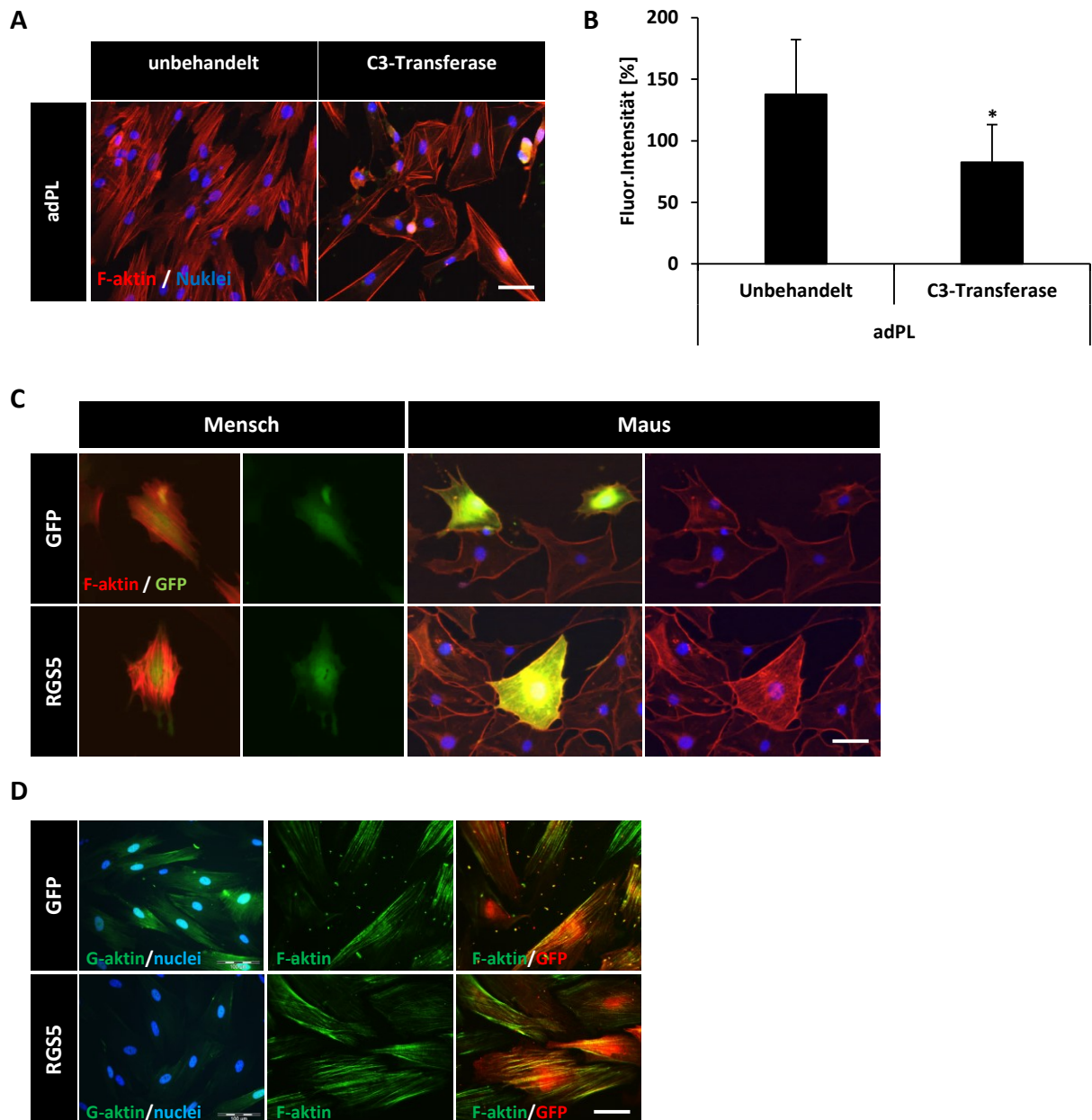
veränderte, zeigte sich ein signifikanter Anstieg von GTP-gebundenem RhoA nach RGS5-Überexpression (Abbildung 33).



**Abbildung 33 Analyse der RhoA-GTP Menge in RGS5- und RGS16-überexprimierenden HUASMCs.** Die Bestimmung der RhoA-GTP Menge erfolgte nach Adenovirus-Vektor-induzierter RGS5- bzw. RGS16-Überexpression (24 Stunden) in HUASMCs mittels RhoA G-Lisa. Die Gesamt-RhoA Menge wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren detektiert (nicht signifikant (n.s.), GFP vs. RGS16, \* $p \leq 0,05$ , GFP vs. RGS5,  $n=6$ ).

Ein Merkmal der gesteigerten RhoA-Aktivität, die mit der RhoA-GTP Menge in GMZ korreliert, ist die Stressfaserbildung<sup>133,134</sup>. Wird die Bindung von GTP an RhoA durch C3-Transferase inhibiert, zeigt sich eine deutliche Reduktion der Stressfaserbildung in den HUASMCs (Abbildung 34 A, B). Um zu zeigen, ob die gesteigerte Aktivität von RhoA durch RGS5 auch funktional ist und in eine verstärkte Stressfaserbildung mündet, wurde in einem nächsten Schritt die Aktinpolymerisierung zu

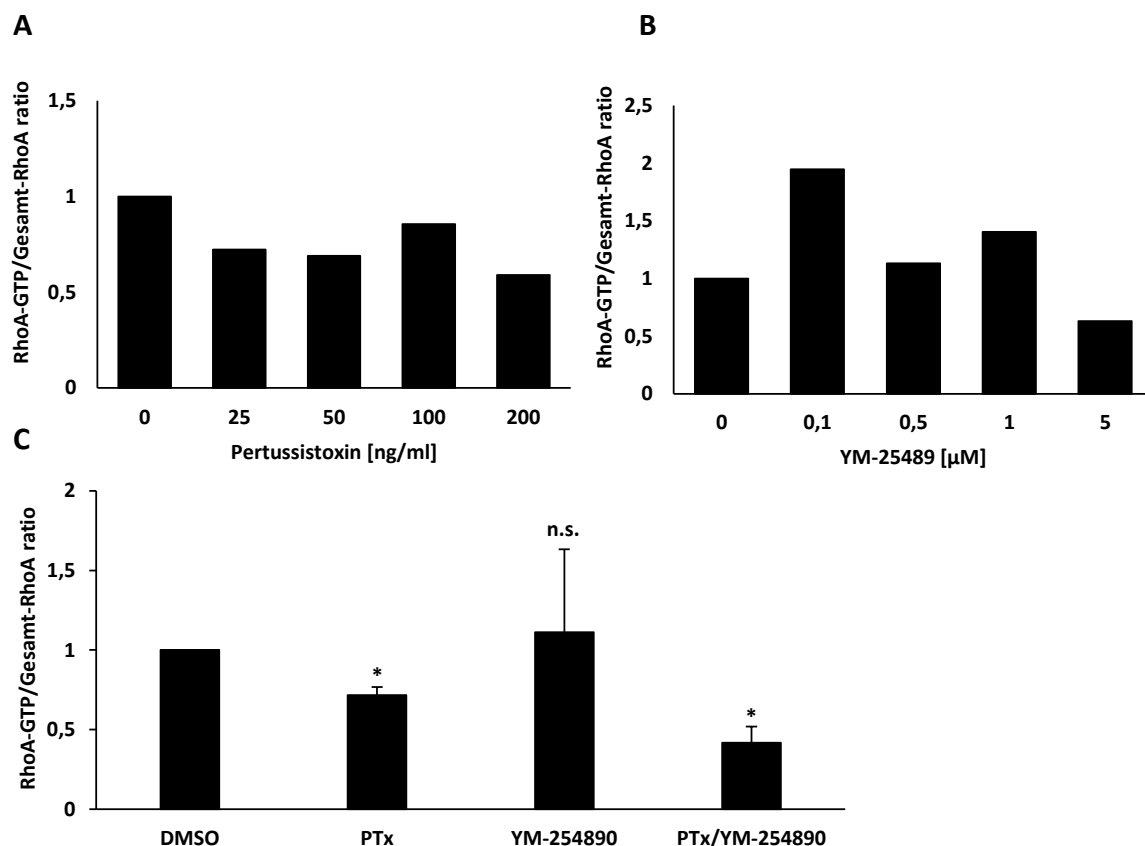
Stressfasern in Zellen beobachtet, die RGS5 überexprimieren. Dazu wurde RGS5 in HUASMCs und in murinen GMZ überexprimiert und im Hinblick auf das Verhältnis zwischen F-Aktin und G-Aktin fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Dabei zeigte sich, dass transduzierte Zellen (grün), die RGS5 verstärkt exprimieren, eine stärkere Stressfaserbildung aufweisen (Abbildung 34 C). Die Menge an nicht gebundenem G-Aktin erscheint in RGS5-überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle (GFP) allerdings geringer (Abbildung 34 D). Je nach Position und Größe der Zelle und damit einhergehender Zelldichte auf dem Plattenboden, schienen die Zellen allerdings eine höhere oder niedrigere Dichte an Stressfasern aufzuweisen. Auf Grund der nicht kontrollierbaren Verteilung der Zellen auf dem Plattenboden wurde an dieser Stelle auf eine Quantifizierung verzichtet.



**Abbildung 34 Analyse des F- und G-aktin-Vorkommens in glatten Gefäßmuskelzellen in Abhängigkeit von RGS5. (A, B)** HUASMCs wurden 24 Stunden nach adenoviraler Transduktion (nicht-kodierendes Plasmid, adPL; MOI10) mit C3-Transferase behandelt und anschließend fixiert. Zur Detektion von filamentösem Aktin, wurde F-Aktin mittels Phalloidin-Alexa Fluor® 546 markiert und fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten am Olympus IX83. (A, rote Fluoreszenz: Phalloidin an F-Aktin, blaue Fluoreszenz: DAPI, \* $p \leq 0,05$ , unbehandelt vs. C3-Transferase behandelt,  $n=3$ , Maßbalken: 100  $\mu\text{m}$ ). **(C)** HUASMCs und MAoSMCs wurden zur RGS5-Überexpression bzw. GFP-Überexpression (Kontrolle) und zur Visualisierung der Aktinfilamente (F-Aktin) adenoviral transduziert (24 Stunden) (Maßbalken: 50  $\mu\text{m}$ ). **(D)** Zudem wurden HUASMCs zur RGS5-Überexpression (RGS5) bzw. GFP-Überexpression (GFP) adenoviral transduziert und anschließend fixiert (48 Stunden). Die Visualisierung von F-Aktin erfolgte mittels Phalloidin (rote Fluoreszenz: Alexa Fluor 546®-gekoppeltes Phalloidin gebunden an F-Aktin), die Visualisierung von globulärem Aktin (G-Aktin) erfolgte mittels DNaseI-Behandlung. Dargestellt werden repräsentative Bilder aus mindestens drei Gesichtsfeldern. (C, rote Fluoreszenz: LifeAct gebunden an F-Aktin, grüne Fluoreszenz: grün-fluoreszierendes Protein (GFP), (D, oben) grüne Fluoreszenz: Alexa Fluor® 488-gekoppelte DNase I gebunden an G-Aktin, blaue Fluoreszenz: DAPI, (D, Mitte und unten) grüne Fluoreszenz: Alexa Fluor® 488-gekoppeltes Phalloidin gebunden an F-aktin, rote Fluoreszenz: GFP,  $n=1$ , Maßbalken: 100  $\mu\text{m}$ ).

## 6.4.2 Untersuchung der RhoA Aktivität in Abhängigkeit von $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{i/o}$

Nachdem gezeigt werden konnte, dass RGS5 unter basalen Konditionen bereits zu einem Anstieg von GTP-gebundenem RhoA und damit stärkerer RhoA-Aktivität führt, sollte nun überprüft werden, ob der durch RGS5 terminierte  $G\alpha_{i/o}$ - bzw.  $G\alpha_{q/11}$ -Signalweg einen Einfluss auf die RhoA-GTP Bindung hat. Dazu wurde zunächst die an GTP gebundene RhoA-Menge nach der Hemmung von  $G\alpha_{i/o}$  bzw.  $G\alpha_{q/11}$  in HUASMCs ermittelt. Dafür wurden HUASMCs mit steigenden Konzentrationen von PTx oder YM-254890 24 Stunden behandelt und hinsichtlich ihrer RhoA-Aktivität zunächst nur qualitativ analysiert.



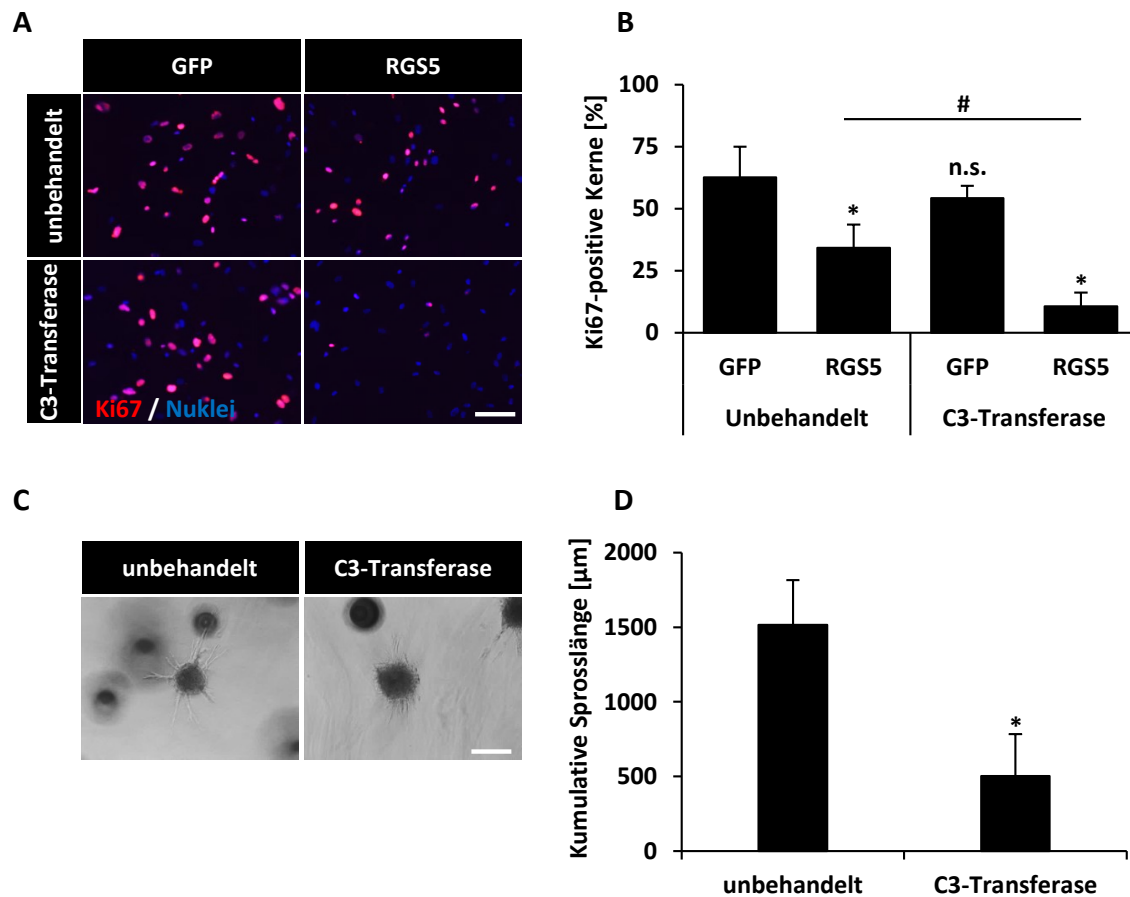
**Abbildung 35 Analyse der RhoA-GTP Menge in PTx bzw. YM-254890-behandelten HUASMCs. (A, B)** Die zelluläre RhoA-GTP Menge in HUASMCs wurde exemplarisch nach Behandlung mit steigender Konzentration von PTx oder YM-254890 (24 Stunden) mittels RhoA G-Lisa bestimmt. **C)** Anschließend erfolgte die Behandlung von HUASMCs mit PTx, YM-254890 oder einer Kombination aus beiden Substanzen (PTx+YM-254890) für 24 Stunden. Die RhoA-GTP Menge wurde mittels RhoA G-Lisa bestimmt. Die Gesamt-RhoA Menge wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren untersucht. Die Grauintensitäten der Banden von Gesamt-RhoA im Western Blot wurden zu den OD-Werten der jeweiligen G-Lisa Proben ins Verhältnis gesetzt. (A, n=1, exemplarisch, B, nicht signifikant (n.s.), DMSO vs. YM-254890, \*p≤0,05, DMSO vs. PTx und PTx/YM-254890, n=3).

Dabei resultierte ein Anstieg in der Konzentration von PTx tendenziell in einer Abnahme von GTP-gebundenem RhoA (Abbildung 35 A), während eine Behandlung mit steigender Konzentration von YM-254890 keiner klaren Aussage folgte (Abbildung 35 B). Um zu untersuchen, ob für die RhoA-Aktivierung eine simultane Inhibition beider Signalwege notwendig ist, wurden hierzu HUASMCs auch mit einer Kombination beider Inhibitoren behandelt. Hierbei zeigten Zellen nach der Behandlung mit PTx eine

signifikante Reduktion von GTP-gebundenem RhoA. Ebenso zeigten sie dies bei einer kombinierten Behandlung mit PTx und YM-254890, während die Behandlung mit YM-254890 keinen signifikanten Einfluss auf die RhoA-Aktivität zeigte (Abbildung 35 C).

#### 6.4.3 Untersuchung des Einflusses von Rho-GTP auf die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen

Da RhoA in pathophysiologischen Remodellierungsprozessen in GMZ eine wichtige Rolle spielt und unter RGS5-Überexpression eine erhöhte Aktivität besitzt, sollten die unter der RGS5-Überexpression beobachteten Effekte zusätzlich mit inaktivem RhoA untersucht werden. Dazu wurde RhoA mithilfe der C3-Transferase gehemmt. Abbildung 36 A und B zeigt einen signifikanten Rückgang in der Anzahl Ki-67-positiver Zellkerne in kultivierten HUASMCs nach RGS5-Überexpression. Die Reduktion der RhoA-Aktivität durch C3-Behandlung zeigte in den Kontrollzellen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl Ki-67-positiver Zellkerne. Somit beeinflusst die durch C3-Behandlung bedingte Hemmung der RhoA-Aktivität die Proliferation der kultivierten GMZ nicht. Allerdings zeigte die gleichzeitige Reduktion der RhoA-Aktivität durch C3-Behandlung kombiniert mit einer Überexpression von RGS5 einen verstärkten Rückgang in der Anzahl Ki-67-positiver Zellkerne. Die Untersuchung der Migration von HUASMCs unter RhoA-Einfluss erfolgte anhand des Gel-Migrationsassays und zeigt eine signifikante Reduktion der Sprossung der HUASMCs nach Hemmung der RhoA-Aktivität (Abbildung 36 C, D).



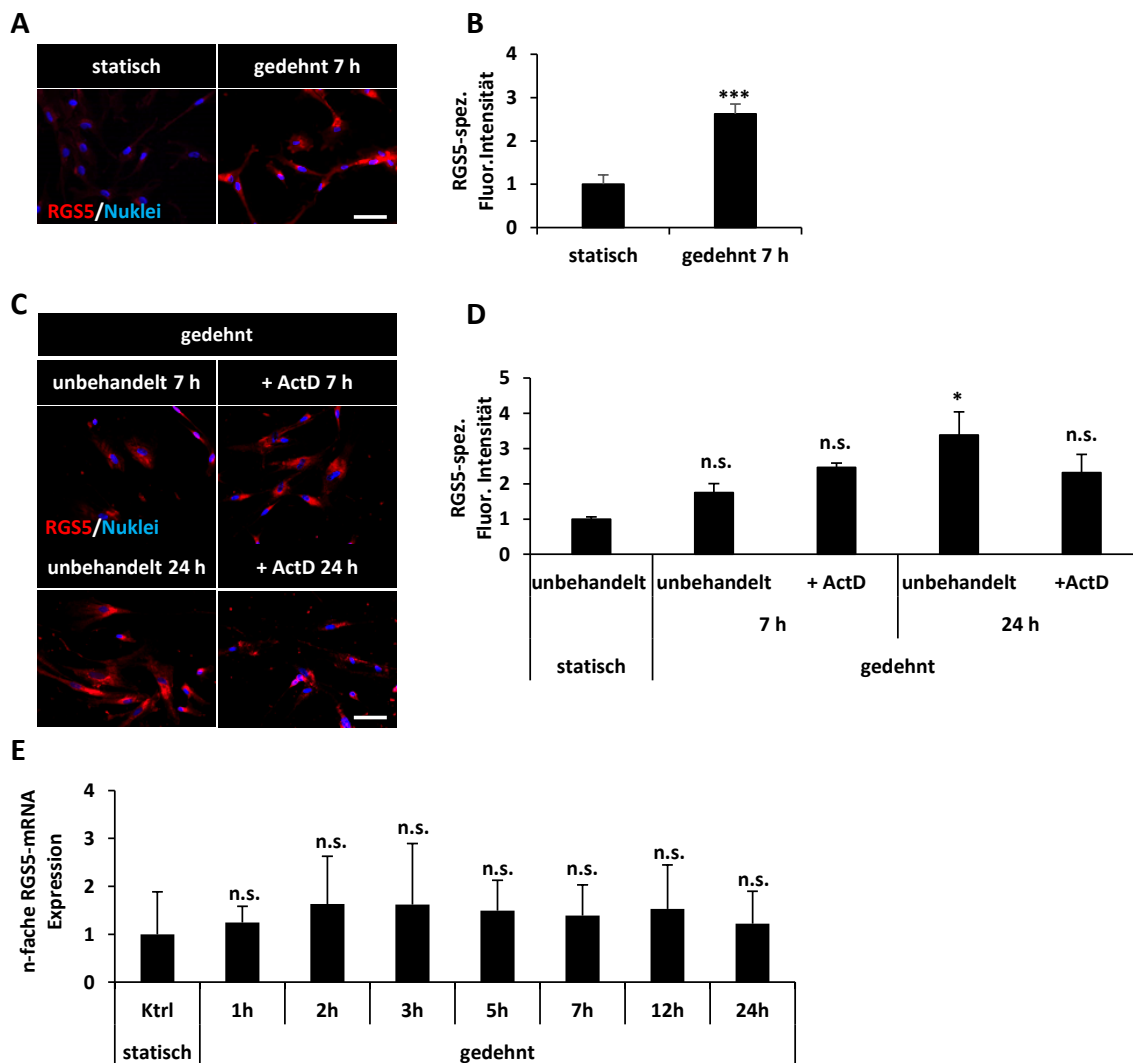
**Abbildung 36 Analyse der Proliferation und Migration in Abhängigkeit von RhoA-GTP. (A, B)** Nach adenoviraler RGS5-Überexpression (24 Stunden) wurden HUASMCs zusätzlich mit C3-Transferase behandelt (12 Stunden), fixiert und hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens mittels Immunfluoreszenzfärbung (Olympus IX83) untersucht. Der prozentuale Anteil Ki-67-positiver Zellkerne (rote Fluoreszenz: Ki-67, blaue Fluoreszenz: DAPI) wurde anhand der ImageJ Software (1.49v) ermittelt und prozentual zur Gesamtzellzahl dargestellt. **(C, D)** HUASMCs wurden mit einem Kontrollplasmid transduziert. Danach erfolgte die Sphäroidformung. Sphäroide wurden im Kollagengel mit C3-Transferase behandelt. Es wurden am nächsten Tag die kumulative Länge der Sprosse in µm ermittelt (A, nicht signifikant (n.s.), GFP unbehandelt vs. GFP C3-Transferase behandelt, \* $p \leq 0,05$  GFP unbehandelt vs. RGS5 unbehandelt, \* $p \leq 0,05$  GFP unbehandelt vs. RGS5 C3-Transferase behandelt, # $p \leq 0,05$  RGS5 unbehandelt vs. RGS5 C3-Transferase behandelt,  $n=3$ , B, \* $p \leq 0,05$  unbehandelt vs. C3-Transferase behandelt, B,  $n=3$ , Maßbalken: 200 µm).

#### 6.4.4 Untersuchung des Einflusses von RGS5 auf die Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen durch biomechanische Dehnung

In den vorangegangenen Versuchen konnte beobachtet werden, dass eine RGS5-Überexpression zur Erhöhung der RhoA-Aktivität in kultivierten, proliferierenden GMZ führt. Die Aktivierung von RhoA spielt insbesondere für die zellulären Antworten auf biomechanische Reize, wie die Anpassung des Zytoskeletts (z.B. Stressfaserbildung), eine übergeordnete Rolle. Vor diesem Hintergrund wurde in den nachfolgenden Untersuchungen überprüft, inwieweit die Reaktion von HUASMCs auf biomechanische Deformation durch RGS5 beeinflusst werden kann. Zunächst wurde untersucht, ob die RGS5-Expression durch biomechanische Dehnung selbst beeinflusst wird. Dabei zeigte sich ein signifikanter



Anstieg in der Intensität der RGS5-spezifischen Fluoreszenz in HUASMCs nach Dehnung (Abbildung 37 A, B). Um zu untersuchen, ob der Anstieg der RGS5-Proteinmenge nach Dehnung durch eine verstärkte Genexpression bedingt ist, wurden HUASMCs über einen Zeitraum von 24 Stunden gedehnt und mit dem RNA-Polymerase-Inhibitor Actinomycin D (ActD) behandelt. Nach 24 Stunden Dehnung kam es in den in Abbildung 37 C abgebildeten, kultivierten GMZ zu einem signifikanten Anstieg der RGS5-Immunfluoreszenz. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität war nicht signifikant nach ActD-Behandlung. Der Vergleich der Werte der Grauintensitäten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen HUASMCs, die mit ActD behandelt und 24 Stunden gedehnt wurden bzw. den unbehandelten



**Abbildung 37 Quantifizierung der dehnungsvermittelten RGS5-spezifischen Fluoreszenz nach Actinomycin D-Behandlung.** (A, B) HUASMCs wurden sieben Stunden biomechanisch gedehnt (13 % Elongation, 0.5 Hz), anschließend fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung (Olympus IX83) hinsichtlich der RGS5-Menge untersucht (A, rote Fluoreszenz: RGS5, blaue Fluoreszenz: Dapi, \*\*\* $p \leq 0,001$  statisch vs. gedehnt,  $n=5$ , Maßbalken: 100  $\mu\text{m}$ ). (C, D) Nach biomechanischer Dehnung (13 % Elongation, 0.5 Hz, 7 h, 24 h) wurden HUASMCs eine Stunde mit Actinomycin D (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) behandelt, anschließend fixiert und nach RGS5-spezifischer Fluoreszenzmarkierung am Olympus IX83 aufgenommen (C, rote Fluoreszenz: RGS5, blaue Fluoreszenz: DAPI, \* $p \leq 0,05$  unbehandelt 7 h vs. unbehandelt 24 h,  $n=3$ , Maßbalken: 100  $\mu\text{m}$ ). (E) HUASMCs wurden in unterschiedlichen Zeitabständen gedehnt, RNA-Gewinnung lysiert und die relative Genexpression von RGS5 mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt. Dazu wurde die Expression von RGS5 auf die des Referenzgens RPL32 normalisiert. (nicht signifikant (n.s.), statische Kontrolle vs. 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7 h, 12 h und 24 h,  $n=3$ ).

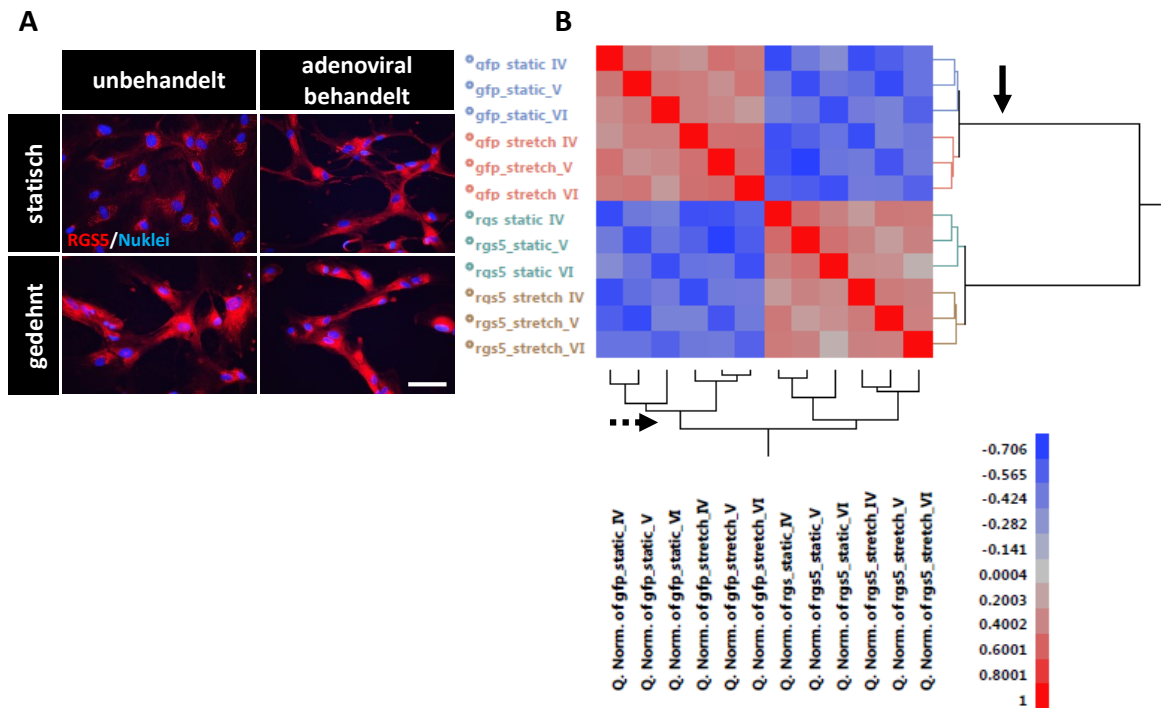
HUASMCs, die 24 Stunden gedehnt wurden. Die Hemmung der mRNA-Synthese hatte offenbar keinen maßgeblichen Effekt auf die RGS5-Proteinmenge bei 7-stündiger Dehnung, tendenziell aber nach 24-stündiger Dehnung. Die RGS5 mRNA-Synthese blieb nach Dehnung ebenfalls unverändert (Abbildung 37 C-E).

#### 6.4.5 Transkriptomanalyse glatter Gefäßmuskelzellen nach RGS5-Überexpression und biomechanischer Dehnung

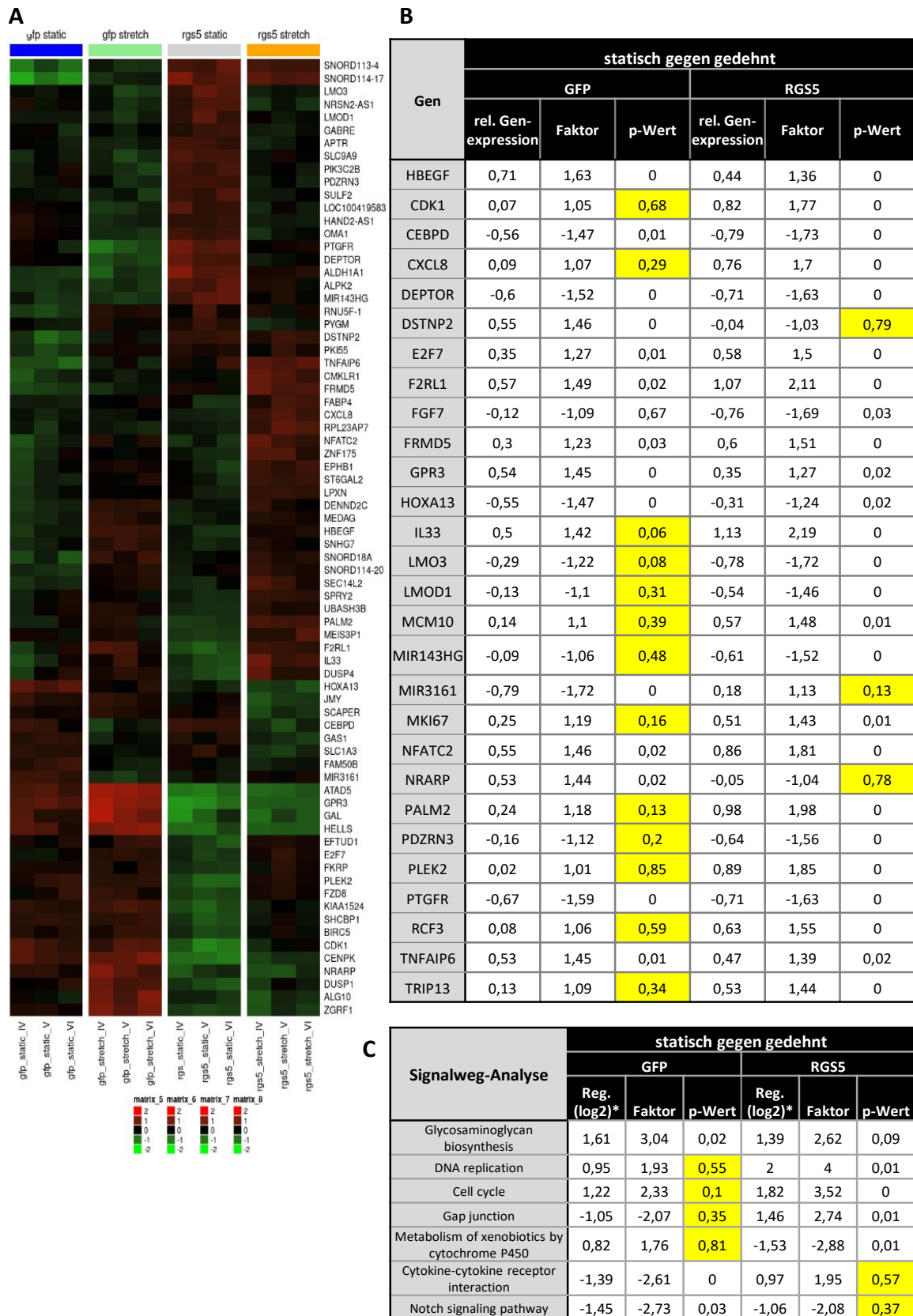
Aus dem zuvor gezeigten Ergebnis geht hervor, dass biomechanische Dehnung die Abundanz des RGS5-Proteins, nicht aber die Expression des *RGS5*-Gens in HUASMCs stimuliert. Unter Berücksichtigung der übrigen Ergebnisse wurde daher angenommen, dass RGS5 die Dehnungsantwort von Zellen beeinflussen kann. Um dies zu überprüfen, wurden HUASMCs gedehnt, die bereits zu Beginn der zyklischen Dehnung GFP (Kontrolle) oder RGS5 überexprimierten. Auswirkungen der Überexpression und gleichzeitigen Dehnung auf das Transkriptom der HUASMCs wurden mit Hilfe einer Transkriptomanalyse erfasst. Hierfür wurden RGS5-überexprimierende HUASMCs 6 Stunden gedehnt. In Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Transduktion mit Adenovirus-Vektoren, war die RGS5-Fluoreszenzintensität in statischen HUASMCs in etwa vergleichbar mit der RGS5-Fluoreszenzintensität in gedehnten HUASMCs (Abbildung 38 A).

Aus der anschließenden Mikroarray-Analyse, die den Qualitätsanforderungen an eine solche Analyse entsprach (Abbildung 38 B), ergab sich folgendes Bild:

In den GFP-überexprimierenden Kontrollzellen gab es nur wenige signifikante Änderungen im Transkriptom (Abbildung 39 A, B und gelbe Markierung). So reagierten diese Zellen nach Dehnung u.a. mit einer verstärkten Expression des *HB-EGF*-Gens (*heparin-binding EGF-like growth factor*), eine für gedehnte GMZ typische Reaktion<sup>135</sup>. In den RGS5-überexprimierenden GMZ zeigte sich ein zusätzlicher signifikanter Anstieg der Expression dehnungsassoziierter Gene wie *CXCL8* und *IL33* (Abbildung 39 B). Ebenso kam es zu einem signifikanten Anstieg der Expression des Proliferationsmarkers *Ki-67* und des *minichromosome maintenance 10 replication initiation factor (MCM10)*, der für die Einleitung der DNA-Replikation<sup>136</sup> zuständig ist, sowie der damit assoziierten Signalwege DNA-Replikation und Zellzykluskontrolle (Abbildung 39 C).



**Abbildung 38 Vergleichende Aufstellung der RGS5-spezifischen Fluoreszenzintensitäten in RGS5 überexprimierenden Zellen und Dendrogrammaufstellung zur Transkriptomanalyse.** (A) HUASMCs wurden nicht-transduziert statisch bzw. nach Dehnungsinduktion (15 % Elongation, 24 Stunden) oder nach Adenovirus-Vektor-induzierter RGS5-Überexpression statisch bzw. nach Dehnungsinduktion (24 Stunden) fixiert und zur RGS5-spezifischen Fluoreszenzdetektion mittels Immunfluoreszenzfärbung (Olympus IX83) markiert (A, rote Fluoreszenz: RGS5, blaue Fluoreszenz: DAPI, n=1, exemplarische Darstellung, Maßbalken: 100 µm). (B) Darstellung der Qualität der Transkriptomauswertung anhand einer *correlation heatmap* mit Dendrogramm. Aufgetragen sind links und unten die einzelnen Versuchsproben (*qfp\_static*, *qfp\_stretch*, *rgs5\_static*, *rgs5\_stretch*). HUASMCs wurden nach adenoviral induzierter RGS5-Überexpression bzw. GFP-Überexpression (18 Stunden) für weitere sechs Stunden biomechanisch gedehnt (15 % Elongation, 0.5 Hz) und zur RNA-Isolierung lysiert. (HUGENE® 2.0 Arraysonden, Affymetrix, n=3)) (siehe 5.2.2.5). Die Unterschiede zwischen den Behandlungen (*qfp\_static*, *qfp\_stretch*, *rgs5\_static*, *rgs5\_stretch*) liefert die Skala am rechten unteren Bildrand. Hier gilt bei einem Wert von 1 (rot) die maximale Übereinstimmung der Expressionswerte, bei einem Wert von -1 (blau) die maximale Unterscheidung in den Expressionswerten der jeweiligen Gruppen.



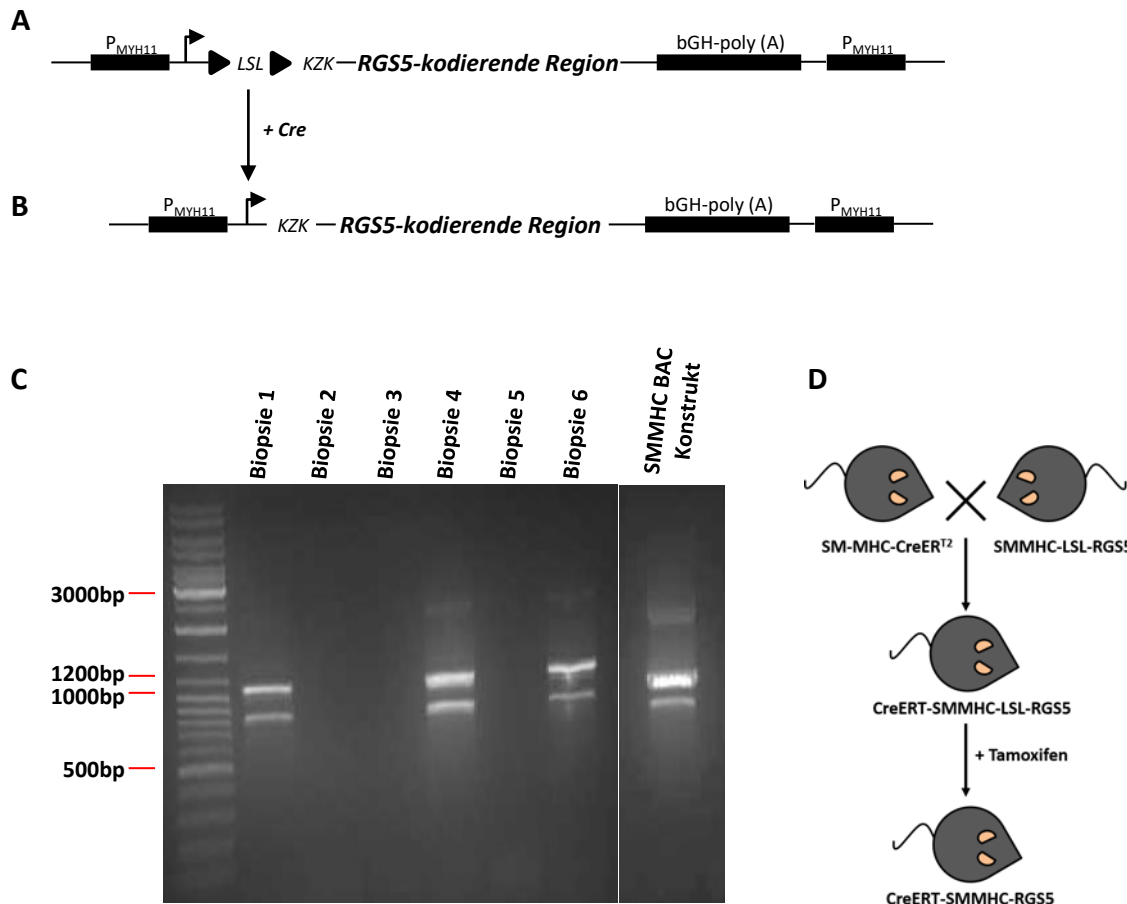
**Abbildung 39** Transkriptomanalyse nach RGS5-Überexpression in und biomechanischer Dehnung von HUASMCs. **(A)** Heatmap-Darstellung von ausgewählten Transkripten, die entweder bei erhöhter RGS5-Expression oder bei GFP-Überexpression oder in beiden Gruppen nach biomechanischer Dehnung in HUASMCs reguliert wurden. **(B)** Vergleichende Liste aus ausgewählten Genen aus (A). Die gelbe Markierung verdeutlicht nicht signifikante Veränderung in der jeweiligen Kondition. Aufgelistet sind ausgewählte Gene, deren differentielle Expression in mindestens einer Kondition eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Veränderung zeigen (HUGENE® 2.0 Arraysonden, Affymetrix,  $n=3$ ) (s.5.2.2.5). **(C)** Zellstoffwechselwege, in denen die unter Dehnung bzw. Dehnung und RGS5-Überexpression signifikant regulierten Gene vertreten sind, nach GSEA.

## 6.5 Generierung der Mauslinie CreERT-SMMHC-LSL-RGS5 zur induzierbaren RGS5-Überexpression in glatten Gefäßmuskelzellen

Ausgehend von den vorangegangenen Ergebnissen scheint die Funktion von RGS5 in kultivierten GMZ kontextabhängig zu sein. Insofern könnte mit einem transgenen Mausmodell (GMZ-spezifische RGS5-Überexpression) die komplexe Funktionsweise von RGS5 *in vivo* und unter Anwendung unterschiedlicher vaskulärer Belastungsmodelle untersucht werden.

Zur Generierung der Mauslinie, die das induzierbare Transgen enthält, sollte zur Transkriptionskontrolle das 100 bp große *smooth muscle myosin heavy polypeptide 11* (Myh11) Promotor-Fragment (P<sub>Myh11</sub>) benutzt werden. So kann sichergestellt werden, dass RGS5 nur in GMZ, die der Aktivität des Myh11 bzw. SM-MHC-Promotors unterliegen, zusätzlich exprimiert wird. In die ATG-kodierende Region des murinen *myh11*-Gens wurde zusätzlich eine flankierende 308 bp große LoxP-Stop-LoxP (LSL) Kasette eingefügt. Solange die LSL-Kasette im Transgen vorhanden ist, kommt es zu einem Transkriptionsstopp an dieser Stelle und die folgende, für RGS5 kodierende Sequenz kann nicht gelesen werden. Erst eine durch Tamoxifen aktivierte CreER<sup>T2</sup> kann durch eine Rekombination der loxP-Seiten die LSL-Kasette aus der Sequenz eliminieren und somit die Transkription des gesamten Transgens ermöglichen. Für die verstärkende Expression des RGS5-Gens wurde der LSL-Kasette eine 9 bp umfassende Kozak-Sequenz (Kzk) angehängt. Im Anschluss an das Kozakfragment erfolgte der Einbau der 546 bp umfassenden kompletten, murinen RGS5-kodierenden Sequenz. Nachfolgend wurde die Nucleotidsequenz des *bovine growth hormone polyadenylation termination signal* (bGH-poly(A)) eingefügt (Abbildung 40 A, B), um die induzierte Expression zu terminieren.

Der erfolgreiche Konstrukttransfer wurde durch Genotypisierung der ersten transgenen Nachkommengeneration nachgewiesen. Dabei konnten drei positive Nachkommen identifiziert werden. Als Kontrolle wurde das pure BAC-Konstrukt aufgetragen (Abbildung 40 C). Diese Nachkommen wurden anschließend gekreuzt mit männlichen Mäusen der SM-MHC-CreER<sup>T2</sup>-Linie. So kann anschließend in den Nachkommen eine SM-MHC-spezifische RGS5-Überexpression nach einer Tamoxifeninjektion durch die CreER<sup>T2</sup> Rekombinase induziert werden (Abbildung 40 D). Die Expression der CreER<sup>T2</sup>-Rekombinase in den SM-MHC-CreER<sup>T2</sup>-Tieren unterliegt ebenfalls der Aktivität des SM-MHC-Promotors.

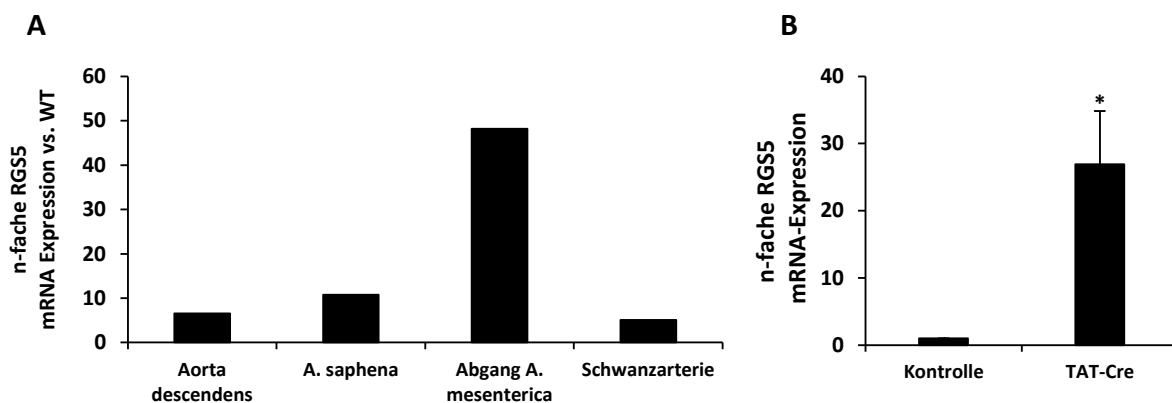


**Abbildung 40 Erstellung und Nachweis des BAC-Konstrukts zur glattmuskelspezifischen RGS5-Überexpression.** **(A)** Das BAC-Konstrukt (98973 bp) enthält einen SM-MHC-Promotorabschnitt (PMYH11), sowie eine LoxP-Stop-LoxP (LSL) Kassette, ein Kozak-Fragment, das codierende *rgs5*-Gen und eine Nucleotidsequenz des *bovine growth hormone polyadenylation termination signal* (bGH-poly(A)). Das Konstrukt wurde mittels pET-Rekombinierungssystem eingebettet in das bacterial artificial chromosome e3.6 (BACe3.6). **(B)** Die Transkription des Transgens wird induziert, indem die CreERT<sup>2</sup>-Rekombinase aktiviert und die LSL aus dem Konstrukt eliminiert wird. **(C)** Zum Nachweis des Konstrukts in den ersten Nachkommen aus der Vorkerninjektion wurden die Schwanzspitzen lysiert und durch ein Agarosegel nach Größe aufgetrennt. Als Kontrolle diente das freie SM-MHC-BAC Konstrukt (von links: Marker (O'GeneRuler™ 100 bp), Biopsie 1, Biopsie 2, Biopsie 3, Biopsie 4, Biopsie 5, Biopsie 6, Positivkontrolle). **(D)** Kreuzungsschema der SM-MHC-CreERT<sup>2</sup>-Maus und der ersten Nachkommengeneration der SMMHC-LSL-RGS5-Maus. Das inaktive Konstrukt im Stammtier enthält eine LSL-Kassette. Das finale transgene Tier wird CreERT-SMMHC-LSL-RGS5 genannt. Das aktive Konstrukt nach Induktion enthält keine LSL-Kassette mehr, die Maus enthält damit die Bezeichnung CreERT-SMMHC-RGS5.

### 6.5.1 Funktionelle Untersuchung der transgenen Mauslinie

Das ins Mausgenom überführte Konstrukt zur RGS5-Überexpression wird aktiviert sobald die CreERT<sup>2</sup>-Rekombinase *in vivo* durch Tamoxifen die Stopkassette aus dem Konstrukt eliminiert und damit den Transkriptionsstart unter dem SM-MHC-Promotor ermöglicht (s. Abbildung 40 A). Um erfassen zu können, ob das Konstrukt im Mausgenom funktionell aktivierbar ist und zur Überexpression von RGS5 führt, wurde zur Induktion der Transkription ein *Founder* mit Tamoxifen behandelt. Zur Kontrolle wurde ein nicht-transgenes Tier ebenfalls mit Tamoxifen behandelt. Anschließend wurden die Aorta

*descendens*, die *A. saphena*, ein zweiter Abgang der *A. mesenterica* und die Schwanzarterie explantiert, lysiert und zur RNA-Isolierung aufbereitet. Verglichen wurde die RGS5-Expression (mRNA) in den Gefäßen des transgenen Tieres mit der RGS5-Expression in denselben Gefäßen des nicht-transgenen Tieres. Die Untersuchung der RGS5 mRNA-Expression in unterschiedlichen Gefäßen eines Tieres nach Behandlungsende zeigte in allen Gefäßen einen Anstieg der RGS5 mRNA-Expression im Vergleich zum Kontrolltier. Der Anstieg der Expression in den Widerstandsgefäßen, wie des zweiten Abgangs der *A. mesenterica*, ist bei diesem exemplarischen Ansatz am höchsten (Abbildung 41 A). Die Funktionalität des Konstrukts konnte ferner untermauert werden durch eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von RGS5 in aus der Aorta weiblicher Nachkommen isolierten und kultivierten GMZ, in denen durch die direkte Zugabe von rekombinanter TAT-Cre-Rekombinase die RGS5-Expression induziert wurde (Abbildung 41 B).



**Abbildung 41 Exemplarischer Funktionalitätsnachweis des transgenen Konstrukts in vivo und in vitro. (A)** Nach fünf-tägiger Tamoxifenbehandlung (1 mg/kg pro Tag) erfolgte die Gefäßentnahme an Tag 28 aus dem Stammtier und nicht-transgenen Tieren. Die Gefäße wurden zur RNA-Isolierung lysiert und entsprechend aufbereitet. Die RGS5 mRNA-Expressionswerte im transgenen Tier wurde gegen die RGS5 mRNA-Expressionwerte in den nicht-transgenen Tieren normalisiert (n=1). **(B)** Kultivierte MAoSMC aus weiblichen transgenen Tieren wurden über Nacht mit rekombinanter Cre Rekombinase behandelt. Die RNA-Gewinnung erfolgte mittels Lyse. Die Quantifizierung erfolgte in **A** und **B** durch quantitative Echtzeit-PKR (B, \*p<0,05 unbehandelt vs. Cre-behandelt, n=3).

## 7 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der grundlegende Einfluss von RGS5 auf den Phänotyp kultivierter, proliferierender GMZ untersucht. Ausgehend von den Einflüssen, die RGS5 in diversen Kontexten, wie der Arteriogenese, Bluthochdruck und Neointimabildung in GMZ hat, wurde der Einfluss einer RGS5-Überexpression in kultivierten GMZ zunächst außerhalb eines komplexen Kontextes geprüft. Dabei lag der Fokus einerseits auf den Effekten von RGS5 auf den Phänotyp kultivierter GMZ. Hierbei war das Proliferations- und Migrationsverhalten von GMZ von Interesse. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag dementsprechend auf der Aufklärung des Mechanismus über den RGS5 die beobachteten Effekte möglicherweise erzielen kann. Zusätzlich wurde die Wirkung von RGS5 auf gedehnte, kultivierte GMZ erforscht.

In der Summe zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit einen möglichen Zusammenhang zwischen der Hemmung der Proliferation und Migration von kultivierten GMZ durch RGS5 und der Hemmung der Aktivität der  $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit. Ferner verweisen die Effekte von RGS5 in gedehnten GMZ auf eine Verstärkung der Dehnungsantwort von GMZ und damit auf eine Rolle als Dehnungssensibilisator für RGS5. Als Konsequenz dieser unterschiedlichen Einflüsse von RGS5 auf GMZ folgen für RGS5 möglicherweise kontextabhängige Rollen in vaskulären Remodellierungsprozessen.

### 7.1 Der Einfluss von RGS5 und RGS16 auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen

GMZ im synthetischen Zustand, d.h. proliferierende und migrierende GMZ, sind ausschlaggebend für die pathologisch bedingte Remodellierung von Blutgefäßen z.B. während der Arteriogenese oder der Neointimabildung. Dazu ändern GMZ unter pathophysiologischen Bedingungen ihren im gesunden Gefäß kontraktile Zustand in einen synthetischen. Dies kann induziert werden durch inflammatorische und mitogene Signale und durch Dehnung. Die Hypothese, die dieser Arbeit zugrunde liegt, beinhaltet die Annahme, dass RGS5 den Phänotyp von GMZ durch die Inhibition der  $G\alpha_{q/11}$ - und/oder  $G\alpha_{i/o}$ -abhängigen Signalwege in Abhängigkeit des vorliegenden physiologischen bzw. pathophysiologischen Zusammenhangs beeinflusst. Die Versuche hierzu fanden im Rahmen dieser Arbeit weitgehend in human kultivierten GMZ *in vitro* statt, um den grundlegenden Einfluss von RGS5 auf diese Zellen zu untersuchen.

**Phänotyp kultivierter GMZ:** Da die Vermehrung von GMZ durch Zelldivision unter Zellkulturbedingungen einen proliferativen Zustand voraussetzt, führt das zur Annahme, dass in Kultur gehaltene, primäre GMZ *in vitro* in einen proliferierenden Zustand übergehen. Rensen *et al.*<sup>35</sup> begründen das mit unterschiedlichen Zellkulturbedingungen, denen die Zellen während der Kultivierung ausgesetzt werden. Solche Bedingungen können die enzymatische Ablösung der primären Zellen zum einen aus dem Gefäßzellverband und zu einem späteren Zeitpunkt vom Plattenboden sein.



Unterschiedliche Beschichtungen von Plattenböden wirken ebenfalls stimulierend auf den Phänotypwechsel von GMZ<sup>137</sup>. Dazu ist bereits berichtet worden, dass sich die in *in vitro*-Versuchen verwendeten Gefäßmuskelzellen in keinem terminalen Zustand befinden. Vielmehr stellen sie eine Mischkultur mit transienten Stadien dar<sup>35,137</sup>. Nach Chang *et al.*<sup>137</sup> befinden sich die primären GMZ zunächst im kontraktiven Zustand und gehen dann mit jeder Zellkulturpassage zunehmend mehr in den migratorischen und dann in den proliferativen Zustand über. Hierbei ist jederzeit - in Abhängigkeit vom Stimulus - eine wechselseitige Entwicklung möglich.

**RGS5 und Proliferation:** Die hier untersuchten GMZ zeigen unter erhöhter RGS5-Expression eine geringere Proliferation und verringerte migratorische Aktivität. Die Hemmung der Zellteilung bestätigte sich, besonders im Rahmen der Transkriptomanalyse, durch die niedrigere Expression klassischer Zellzyklusgene wie *CDK1*, *CDK2*, *CCNE2*, *CDC6*, *PCNA* und *E2F1* im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sowohl CDK1 als auch CDK2 regulieren den Übergang der Zelle von der G0/G1-Phase in die DNA-Synthese bzw. S-Phase<sup>138</sup>. Dabei erfolgt der Eintritt in den Zellzyklus in der G0/G1-Phase über CDK1, durch dessen Komplexierung mit weiteren Zyklinen wie CDK4 und CDK2, während CDK2 zusätzlich - unter Mitwirkung von CCNE2 - durch die Phosphorylierung des Retinoblastom-Genprodukts zur Inhibition der Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F1 führt. Dies wiederum erlaubt den Eintritt in die G1/S-Phase und hat schließlich die Akkumulation von PCNA zur Folge<sup>139,140</sup>. Diese Effekte auf HUASMCs wurden für RGS5 auf Transkriptomebene in diesem Umfang bislang noch nicht zusammenhängend erfasst. Jedoch bestätigen Daniel *et al.*<sup>114</sup> die gehemmte Synthese von CDK1 und die niedrige Phosphorylierung des Retinoblastom-Genprodukts nach der Überexpression von RGS5. Die Autoren schließen in ihrer Arbeit von diesen Veränderungen in GMZ, bedingt durch eine RGS5-Überexpression, auf eine hemmende Eigenschaft von RGS5 auf die Neointimabildung, da es während dieser zu einer Verstärkung der Proliferation von GMZ kommt.

Die parallel erhöhte Expression von TGFβ1 und der microRNA miR-145 geben einen Hinweis auf eine Redifferenzierung von GMZ zum kontraktiven Phänotyp. Obwohl das multifunktionelle Zytokin TGFβ auch als proliferationsverstärkender Faktor gelistet wird, können insbesondere die Isoformen TGFβ1 und TGFβ2 konzentrationsabhängig die Proliferation unter Zellkulturbedingungen reduzieren<sup>141-143</sup>. Sobald TGFβ1 die miR-145-Aktivität induziert, erleichtert miR-145 über die Repression von KLF-4 (s. 4.2.3) die Bindung von Myokardin an die CArG-Box. Diese Bindung von Myokardin ist wiederum zuständig für die Expression der glattmuskelzellspezifischen Marker für den kontraktiven Phänotyp Calponin und SM-MHC<sup>144</sup>. Da allerdings die Freisetzung und Aktivierung von TGFβ dafür nötig ist, bedarf diese Schlussfolgerung weiterer Versuche.

Eine Verstärkung der miR-145-Aktivität im pathophysiologischen Kontext der Remodellierung führt wiederum zur verringerten Expression der glattmuskelzellspezifischen Markergene *SM-MHC* und *CNN1* und zur Hemmung der Neointimabildung<sup>41,145</sup>. Ein Zusammenhang zwischen RGS5 und miR-145

in HUASMCs wurde zuvor noch nicht auf Transkriptomebene gezeigt, allerdings berichten Boettger *et al.*<sup>146</sup> von einer Reduktion der RGS5-Genexpression in miR-143/miR-145-defizienten Mäusen. Es gibt demnach belastbare Anhaltspunkte, um in weiteren Schritten die miR-145-Aktivität in Abhängigkeit von RGS5 zu untersuchen.

Die Veränderung in der Expression der Markergene für den kontraktile Phänotyp wird in den Untersuchungen dieser Arbeit durch das vermehrte Vorkommen von Calponin nach RGS5-Überexpression teilweise bestätigt. Im Vergleich dazu blieb die Abundanz von SM-MHC in den GMZ unverändert. Die verstärkte Expression der MLCK-mRNA – MLCK ist ein essentieller Bestandteil des Kontraktionsapparates der Zelle und des kontraktile Phänotyps – muss in weiteren Versuchen auf Proteinebene validiert werden. Bestätigt sich dies zusätzlich zu der erhöhten Calponin-Abundanz nach RGS5-Überexpression, könnte dies einen Übergangszustand der GMZ bestätigen, von dem Beamish *et al.*<sup>147</sup> bereits berichteten. Dies lässt die Vermutung zu, dass kultivierte, proliferierende GMZ unter RGS5-Einwirkung eine Redifferenzierung durchlaufen. Dabei passieren sie ein Differenzierungsspektrum, beginnend beim synthetischen Phänotyp, gefolgt von einem Phänotyp, in dem die Zellen verstärkt migrieren, hin zu einem kontraktile Phänotyp. Dies entspräche der Annahme, dass Proteine des kontraktile Apparats ebenfalls transient von den Zellen synthetisiert werden<sup>26,29,137</sup>. Somit erscheint Calponin während der Redifferenzierung im mittleren Differenzierungsspektrum (s. 4.2.3) von GMZ, während SM-MHC nur in GMZ vom ruhenden kontraktile Phänotyp gebildet wird<sup>29</sup>. Die unter der Überexpression von RGS5 beobachtete reduzierte Genexpression der Zellzyklus-assoziierten Gene und die erhöhte Expression von miR-145 lässt den Schluss zu, dass die GMZ zumindest unter Zellkulturbedingungen durch RGS5 einen Wandel vom synthetischen zum kontraktile Phänotyp durchlaufen. RGS5 terminiert in seiner GAP-Funktion die  $G\alpha_{q/11}$ - bzw.  $G\alpha_{i/o}$ -bedingte Kontraktion. In Anbetracht dieser Tatsache, ist anzunehmen, dass RGS5 unter der Bedingung, dass Zellen *in vitro* in einem synthetischen, nicht-kontraktile Zustand sind, eine andere Funktion wahrnimmt.

**RGS5 und Migration:** RGS5-überexprimierende Zellen zeigten eine verminderte Migration im Sphäroid-basierten Migrationsansatz. Gestützt von den *in vitro*-Beobachtungen beeinflusst RGS5 den Phänotyp demnach dahingehend, dass dieser vom aktiven zum ruhenden Phänotyp zu wechseln scheint. Dies bestätigt die Beobachtungen von Daniel *et al.*<sup>114</sup>, die in humanen GMZ aus der Koronararterie *in vitro* ebenfalls RGS5 adenoviral überexprimierten. In einem Transmigrationsansatz beobachten die Autoren eine reduzierte Migration von Zellen, die RGS5 überexprimieren. Gunaje *et al.*<sup>148</sup> berichten wiederum von verstärkt migrierenden GMZ bei RGS5-Defizienz. Die Zellen wurden hierbei mit PDGF-BB stimuliert, das den PDGF-Rezeptor aktiviert, der u.a. auch G-Protein-abhängige Signalwege beeinflusst und selbst von diesen beeinflusst wird. Xu *et al.*<sup>104</sup> berichten zudem von einer reduzierten Migration von humanen Lungenkrebszellen nach RGS5-Überexpression, untersuchen

hierzu jedoch keinen Mechanismus. In dieser Arbeit konnte in einem initialen Versuch ebenfalls gezeigt werden, dass RGS5-überexprimierende Zellen, mit Zunahme der RGS5-Überexpression ein tendenziell schwächeres Migrationsverhalten aufweisen.

Die Abnahme des Migrationsverhaltens, analog zur Zunahme der RGS5-Expression, könnte ein zusätzlicher Hinweis auf einen dynamischen Phänotypwechsel sein, der sich parallel zum Anstieg der RGS5-Expression vollzieht und von der vorhandenen RGS5-Proteinmenge abhängt. Während dies eine initiale Beobachtung innerhalb dieser Arbeit war, schildern Sandison *et al.*<sup>149</sup> anhand einer *Time lapse* Analyse von GMZ einen umgekehrten Übergang vom kontraktilem in den mehr migratorischen hin zum synthetischen Phänotyp *in vitro*. Hierfür ließen sie GMZ aus der Aorta von Ratten migrieren und beobachteten deren weiteres Migrationsverhalten *in vitro*<sup>149</sup>. Sie detektierten dabei außerdem eine Abnahme in der Proteinmenge von SM-MHC in den Zellen. Während die Autoren klar verdeutlichen, dass primäre GMZ, sobald sie kultiviert werden, mit einiger Zeit den synthetischen Phänotyp annehmen, konnte innerhalb dieser Arbeit in kultivierten Zellen ein gegenläufiger Verlauf beobachtet werden. Die zunehmende RGS5-Proteinmenge scheint einen Wandel vom synthetischen Phänotyp und damit von bereits verstärkt proliferierenden und migrierenden GMZ zum ruhenden kontraktilem Phänotyp ohne nennenswerte Migration von GMZ zu bewirken.

**RGS16 und Proliferation:** Neben RGS5 zeigte auch RGS16 in den nachfolgenden Untersuchungen eine Hemmung der Proliferation von kultivierten, proliferierenden GMZ. RGS5 und RGS16 unterscheiden sich als Mitglieder der B/R4-Subfamilie strukturell nur minimal. Durch ihre RGS-Domäne sind beide Proteine charakteristische Hemmer der  $G\alpha_{q/11}$  und  $G\alpha_{i/o}$ -Signalwege<sup>83</sup> (s. 4.4). Die Proliferation von GMZ könnte durch die GAP-Aktivität beider RGS-Proteine innerhalb des GPCR/ $G\alpha_{q/11}$ -Signalwegs erklärbar sein. Tanski *et al.*<sup>150</sup> bestätigen hierfür eine gehemmte  $G\alpha_{q/11}$ /PLC- $\beta$ /ERK1/2-Signalkaskade in Ang II-stimulierten GMZ. Eine durch die aktive  $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit häufig inhibierte cAMP/PKA-Signalkaskade kann die Proliferation von GMZ allerdings ebenfalls hemmen<sup>151</sup>. Liang *et al.*<sup>152</sup> berichten von einer verminderten Proliferation in Zellen der Brustkrebszelllinie MCF7, in denen RGS16 überexprimiert wurde. Hierbei wirkte RGS16 hemmend auf den Phosphoinosid-3-Kinase (PI3K)-Signalweg. Dieser Weg setzt die Aktivierung von Akt, mTOR und P70 S6 Kinase zur Steuerung der Proliferation und Migration voraus<sup>153</sup>, indem es die regulatorische PI3K-Untereinheit p85 $\alpha$  hemmt. Eine übermäßige RGS16-Proteinsynthese wirkt zudem hemmend auf die Aktivierung der p38-MAPK-Signalkaskade<sup>154</sup>. Eine gleichzeitige Verbindung zu p53 lässt De Vries *et al.*<sup>90</sup> schlussfolgern, dass RGS16 durch p53 transkriptionell induziert wird und inhibitorisch in Proliferationsmechanismen involviert ist. So könnte RGS16 diese weiteren Signalwege zur Beeinflussung der Proliferation nutzen.

**RGS16 und Migration:** Während RGS5 die Migration hemmen konnte, blieb das Migrationsverhalten der HUASMCs durch eine RGS16-Überexpression unverändert. Dies könnte erneut auf eine unterschiedliche Beeinflussung von Signalwegen durch beide RGS-Proteine zurückzuführen sein.

RGS16 interagiert durch seine NH<sub>2</sub>-terminalen 31 Aminosäuren mit einem dritten, Gα<sub>13</sub>-abhängigen Signalweg. RGS16 kann aufgrund dieser Aminosäuren unabhängig von seiner RGS-Region posttranslational am Cystein Cys2 und Cys3 modifiziert und palmitoyliert werden<sup>92,155</sup>. Diese Eigenschaft ist essentiell für die Lokalisierung des Proteins in Membrannähe und ist von funktioneller Bedeutung für dessen GAP-verstärkende Aktivität<sup>155</sup>. Durch die Bindung an Gα<sub>13</sub> kann RGS16 dessen Membranbindung hemmen und eine reduzierte Interaktion der Untereinheit mit dessen Effektor p115-RhoGEF zur Folge haben. Die Funktion des p115-RhoGEF besteht wiederum in der Aktivierung von RhoA (s. 4.4). Die Affinität von RGS16 zu Gα<sub>13</sub> ist im Vergleich zu p115-RhoGEF und dessen Affinität zu Gα<sub>13</sub> zwar schwächer, aber dennoch funktionsbeeinträchtigend<sup>86</sup>. Aus diesem Grund können RhoA-bedingte Effekte durch RGS16-Aktivität möglicherweise geschwächt werden. Allerdings hatte RGS16 in dieser Arbeit in kultivierten GMZ keinen Effekt auf die Aktivität von RhoA.

## 7.2 Der Einfluss von MAP-Kinasen auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen

Im Rahmen dieser Arbeit kam es unter einer RGS5-Überexpression u.a. zur simultan reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2, JNK1/2/3, c-Jun und Akt (Ser-473), während eine RGS16-Überexpression sich u.a. in einer reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2 und c-Jun und einer erhöhten Phosphorylierung von Akt (Ser-473) äußerte. Die unter der RGS5-Überexpression beobachteten Effekte auf die Proliferation und Migrationen können bedingt sein durch Signalkaskaden, die wiederum die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK1/2/3 voraussetzen. Deswegen soll im weiteren Verlauf die Diskussion auf die MAP-Kinasen, insbesondere auf ERK1/2, beschränkt werden. In Bezug auf die Migration wird die Akt-Phosphorylierung zusätzlich diskutiert.

**RGS5 bzw. RGS16 und ERK1/2 in vitro:** Sowohl RGS5 als auch RGS16 inhibierten beide, wie durch den Array gezeigt, die Phosphorylierung von ERK1/2 im Vergleich zur Kontrolle. Der Array gibt dabei einen ersten Eindruck der Veränderungen in der Phosphorylierung der MAP-Kinase wieder und vergleicht diese Veränderungen nicht zur jeweils unphosphorylierten Proteinmenge. In der darauf folgenden Untersuchung, in der die Menge von phosphoryliertem ERK1/2 zur Gesamtmenge von ERK1/2 ins Verhältnis gesetzt wurde, konnte das Array-Ergebnis bezüglich der reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2 in RGS5-überexprimierenden Zellen bestätigt werden. Für RGS16 konnte das Array-Ergebnis nicht validiert werden. Bereits Anger *et al.*<sup>89</sup> berichten von einem ausbleibenden Einfluss von RGS16 auf die Aktivierung von ERK1/2 in COS-7 Zellen (immortalisierte Fibroblasten aus der Meerkatzenleiere), während sie eine reduzierte ERK1/2-Phosphorylierung durch RGS5 durch die Untereinheiten Gα<sub>q/11</sub> und Gα<sub>i/o</sub> beobachten. Gleichzeitig bestätigen Daniel *et al.*<sup>114</sup> die reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 nach adenoviral induzierter Überexpression von RGS5 in humanen GMZ.

**RGS5 bzw. RGS16 und ERK1/2 *in vivo*:** Wenig ist bekannt über den Einfluss von RGS16 auf die Phosphorylierung von ERK1/2 im kardiovaskulären Kontext. Karim *et al.*<sup>156</sup> berichten allerdings von einer RGS16-defizienten Maus, die einen Anstieg in der Aktivierung von Thrombozyten aufweist. Die Autoren führen das auf eine Verstärkung der Phosphorylierung von ERK1/2 in Thrombozyten in Abwesenheit von RGS16 zurück. Möglicherweise spielt RGS16 dabei eine Rolle in der Kontrolle der basalen ERK1/2-Phosphorylierung. Cho *et al.*<sup>103</sup> stellten wiederum in einem RGS5-defizienten Mausmodell einen dauerhaft niedrigen Blutdruck fest. Gleichzeitig zeigten sie, dass die basale Menge der ERK1/2-Phosphorylierung in RGS5-defizienten Tieren erhöht ist im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Dennoch beobachten die Autoren in den GMZ von RGS5-defizienten Mäusen einen weiteren Anstieg in der Phosphorylierung von ERK1/2 nach S1P- und Natriumnitroprussid (SNP)-Stimulation im Vergleich zu den jeweiligen Zellen aus Wildtyp-Mäusen. Auf Ang II und ET-1 reagierten die Zellen aus diesen Mäusen nicht mit einer Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung. Holobotovskyy *et al.*<sup>112</sup> berichten von einem erhöhten mittleren arteriellen Druck in RGS5-defizienten Mäusen mit einem unterschiedlichen Mausstamm. Sie beobachten außerdem einen Anstieg in der ERK1/2-Phosphorylierung nach Ang II-Behandlung in RGS5-defizienten Mäusen und begründen das durch die enthemmte  $G\alpha_{q/11}$ -Aktivität. Daneben berichten Daniel *et al.*<sup>114</sup>, zusätzlich zu ihrem *in vitro* Befund, von einer Hemmung der Phosphorylierung von ERK1/2 *in vivo* durch eine Überexpression von RGS5. Unter allen Bedingungen scheint die Wirkung von RGS5 auf die Phosphorylierung von ERK1/2 unstrittig und von besonderer Relevanz. Mit welcher Konsequenz allerdings die durch RGS5 herbeigeführte Regulierung von ERK1/2 in unterschiedlichen Kontexten wirkt, bleibt Gegenstand genauerer Forschung.

**ERK1/2 und Proliferation:** Die Proliferation von kultivierten GMZ setzt eine Phosphorylierung von MAP-Kinasen voraus. Durch deren Aktivierung kann über unterschiedliche, nachfolgende Signalwege die Proliferation von GMZ induziert werden. Die Aktivität von JNK1/2/3 ist laut Watson *et al.*<sup>157</sup> im Kontext der Proliferation und Neointimabildung ausschlaggebend, weshalb die gleichzeitige Dephosphorylierung des Zielmoleküls c-Jun und JNK1/2/3 durch die RGS5-Überexpression - nicht durch die RGS16 Überexpression - einen wichtigen Hinweis zur Hemmung der MAPK-Signalwege durch RGS5 gibt<sup>48,157</sup>. RGS5 unterbindet zudem die Aktivität der  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheiten oberhalb der MAPK-Signalwege. Die aus der RGS5-Überexpression hervorgegangene, reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 gibt einen ersten Hinweis auf die Beeinflussung der Proliferation durch den  $G\alpha_{q/11}$ /PLC- $\beta$ /DAG/PKC/ERK-Signalweg. Die reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 wirkt auf die Aktivität des CDK Inhibitors 1b, p27<sup>Kip1</sup> verstärkend. Der CDK Inhibitor 1b hemmt Zykline, die die Zellteilung vorantreiben. ERK1/2 unterdrückt wiederum dessen Inhibitoreigenschaft, sodass die Zelle sich weiterhin teilt<sup>158</sup>. Wird nun die Aktivität von ERK1/2 gehemmt, kann p27<sup>Kip1</sup> die Zellteilung weiterhin arretieren. Einen ersten Hinweis auf den Zellzyklusarrest gab, wie bereits erwähnt, die Transkriptomanalyse.

Die unmittelbare Hemmung der  $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheit und des damit verbundenen Signalwegs  $G\alpha_{q/11}/PLC-\beta/IP_3/Ca^{2+}$  durch den  $G\alpha_{q/11}$ -Inhibitor YM-254890 nach Ang II-Stimulation konnte die Kalziumantwort der Zelle reduzieren und damit den klassischen Effekt der RGS5-Überexpression nachahmen (s. 5.2.2.8). Dennoch zeigte die Hemmung von  $G\alpha_{q/11}$  oberhalb von PLC- $\beta$  und damit von PKC und ERK1/2 keinen Effekt auf die ERK1/2-Phosphorylierung. Tanski<sup>150</sup> *et al.* wiederum wiesen in Ang II-stimulierten pulmonalen GMZ eine Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung nach gezielter  $G\alpha_q$ -Hemmung durch den Inhibitor GP-2A nach. Zou *et al.*<sup>23</sup> bestätigen diesen Effekt durch die Behandlung von explantierten Gefäßen nach Gefäßverletzung mit GP-2A. An dieser Stelle wird deutlich, dass die Arbeitsgruppen die ihren Arbeiten zugrunde liegenden GMZ zunächst stimulieren und dann die G-Proteinuntereinheit inhibieren. In dieser Arbeit wurden allerdings kultivierte, proliferierende GMZ ohne Agonist-spezifische Stimulation verwendet.

Daniel *et al.*<sup>114</sup> geben an, dass durch die adenovirale RGS5-Überexpression reduzierte ERK1/2-Phosphorylierung über die MEK1/2-Aktivität bestimmt wird. Hierfür inhibierten sie MEK1/2 mit Hilfe des Inhibitors PD98059 und zeigten dadurch eine ähnliche Reduktion von phosphoryliertem ERK1/2 wie in RGS5-überexprimierenden Zellen<sup>114</sup>. Während dieser Ansatz noch ein Analogieschluss bleibt und kritisch zu betrachten ist, erweiterten die Autoren ihren Versuchsansatz durch eine Co-Transduktion der Zellen mit RGS5 und einem Konstrukt, welches eine konstitutiv aktive MEK1 exprimiert<sup>114</sup>. Im Vergleich zu den lediglich RGS5-exprimierenden Kontrollen zeigen die Daten aus dem Co-Transduktionsansatz einen signifikanten, wenngleich unverhältnismäßigen Anstieg in der ERK1/2-Phosphorylierung. Allerdings fehlt in diesem Ansatz der Effekt einer alleinigen MEK1-Überexpression als Positivkontrolle. Aus diesem Versuch lässt sich nicht schließen, dass die Überexpression der konstitutiv aktiven MEK1 den Effekt von RGS5 über den RGS5-gelenkten Signalweg aufhebt, sondern lediglich, dass es zu einer Aktivierung von ERK1/2 kommt. Demnach sind auch diese Daten noch kritisch zu hinterfragen.

Des Weiteren untersuchten Li *et al.*<sup>159</sup> den durch ERK1/2 bestimmten Proliferationsmechanismus unter RGS5-Überexpression bzw. -Defizienz im Rahmen der dehnungsinduzierten Herzhypertrophie. Sie berichteten bei RGS5-Defizienz von einer verstärkten kardialen Hypertrophie und Fibrose und bei RGS5-Überexpression von einer verminderten Hypertrophie und Fibrose parallel zu einer minimierten MEK1/2 und ERK1/2-Aktivität<sup>159</sup>. Damit verdeutlichen Li *et al.* eine Relevanz der Effekte von RGS5 auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und legitimieren dahingehende weiterführende Untersuchungen.

**ERK1/2-Phosphorylierung durch PKC:** Nach Behandlung von kultivierten GMZ mit dem DAG-Strukturanalogon PMA konnte in dieser Arbeit unter GPCR-unabhängigen Bedingungen ein Anstieg in der ERK1/2-Aktivität nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Beteiligung der DAG unterhalb der  $G\alpha_{q/11}$ -Signalkaskade an der Verstärkung des MAPK-Signalwegs<sup>160</sup>. Allerdings zeigte sich bei direkter Hemmung von PKC durch den PKC-Inhibitor Calphostin C unter gleichen Bedingungen keine Reduktion

der ERK1/2-Aktivität in HUASMCs. Dies bestätigt zwar eine Rolle von PKC für die Phosphorylierung der ERK1/2 in durch die Kulturbedingung stimulierten Zellen. Dieser Befund zeigt aber auch, dass die PKC nicht für die basale ERK1/2-Phosphorylierung in kultivierten GMZ, wie in dieser Arbeit beobachtet, verantwortlich ist. Daniel *et al.*<sup>114</sup> gehen zwar basierend auf ihren Untersuchungen bezüglich der MEK/ERK-Abhängigkeit *in vivo* im Kontext der Neointimabildung von einer PKC/RAF/MEK/ERK-Kaskade aus. Allerdings wirft die Beobachtung in dieser Arbeit die Frage auf, ob die Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung in kultivierten GMZ *in vitro* möglicherweise über einen weiteren, von RGS5 beeinflussten Signalweg unterbunden werden kann und nicht ausschließlich über den  $G\alpha_{q/11}$ /PLC- $\beta$ /DAG/PKC/MEK/ERK-Signalweg verläuft.

**ERK1/2-Phosphorylierung durch PKA:** Tatsächlich terminiert RGS5 neben der Aktivität der Untereinheit  $G\alpha_{q/11}$  auch die Aktivität der Untereinheit  $G\alpha_{i/o}$ . Die  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Inhibition der Adenylatzyklase ist ein weiterer Mechanismus, über den die Proliferation von GMZ mittels ERK1/2-Aktivität kontrolliert wird (s. 4.3.1). Solange die Adenylatzyklase gehemmt ist, kann cAMP nicht vermehrt gebildet werden. Die nachfolgende Aktivität der PKA ist an cAMP gekoppelt und wird durch die aktive  $G\alpha_i$ -Untereinheit ebenfalls gehemmt. Bei einer Hemmung der Aktivität der  $G\alpha_i$ -Untereinheit wird die Adenylatzyklase verstärkt aktiv und bildet vermehrt cAMP. Dies resultiert in einer verstärkten PKA-Aktivität, die wiederum ERK1/2 hemmt. Eine verringerte ERK1/2-Aktivität bedeutet nachfolgend, dass p27<sup>Kip1</sup> im Zellkern nicht inaktiviert wird und somit den Eintritt in den Zellzyklus inhibiert<sup>158</sup>. Eine Forskolin-abhängige Erhöhung der Adenylatzyklase-Aktivität resultierte in einer cAMP-Erhöhung (s. 5.2.2.9), einer reduzierten Proliferation und Migration und einer darauf folgenden Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung in kultivierten GMZ analog zu RGS5.

Die Anreicherung von cAMP durch die Inhibition des  $G\alpha_{i/o}$ -Signalwegs durch Forskolin oder PTx und die daraufhin verringerte Inhibition der Proliferation weisen auf einen aktiven cAMP/PKA-Signalweg hin. Forskolin ist durch seine direkte Wirkung auf die Adenylatzyklase in *in vitro*-Studien innerhalb dieser Arbeit und in der Literatur eindeutig als ERK1/2-hemmend dargestellt worden. Zudem wird dessen antiproliferative Wirkung über die Hemmung der CDK1 über PKA durch den Transkriptionsfaktor *cAMP-response element binding factor* (CREB) erklärt<sup>161</sup>. Die hier erhobenen Daten deuten zumindest an, dass die von RGS5 erzielten repressiven Effekte auf die Proliferation und Migration von GMZ durch die Blockade der  $G\alpha_{i/o}$ -inhibitionsbedingten Enthemmung der PKA erfolgen kann. Allerdings ist eine direkte Interaktion zwischen RGS5 und der Adenylatzyklase nicht bekannt.

Eine aktive Adenylatzyklase kann nicht nur den cAMP/PKA-Signalweg einleiten. Auf zelluläre Prozesse wie Migration und Proliferation kann cAMP durch die Interaktion mit dem *exchange protein activated by cAMP* (Epac) durch eine Akt-Inaktivierung Einfluss nehmen<sup>162</sup>. Epac ist ein GEF, der die Aktivität der kleinen G-Proteine Rap1 und Rap2 reguliert und somit auch als RapGEF bezeichnet wird<sup>162</sup>. Dabei wirkt es zusätzlich in einem Komplex mit PKA. Zur Verstärkung der Komplexierung dient das A-Kinase

Ankerprotein (AKAP)<sup>163</sup>. Die im Kontext der Neointimabildung bedingte Proliferation konnte laut Hewer *et al.*<sup>74</sup> durch die synergistische Aktivität von PKA und Epac und der daraus resultierenden Hemmung der ERK1/2 und JNK1/2-Aktivität in GMZ der Ratte reduziert werden. Die hier beobachtete Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK1/2 und deren Zielgen *c-Jun* unter RGS5-Überexpression deutet möglicherweise auf diesen Mechanismus hin. Gleichzeitig zeigen Gunaje *et al.*<sup>148</sup> einen unmittelbaren Anstieg in der Phosphorylierung von ERK1/2, Akt und JNK nach Reduktion der RGS5-Expression in Gefäßmuskelzelllinien und bestätigen damit den Befund in dieser Arbeit zumindest bezüglich der RGS5-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierung.

**Der Einfluss von Akt auf die Proliferation und Migration:** Allerdings aktivieren Epac/PKA ebenso auch Akt, das führt wiederum über zahlreiche Mechanismen zur Proliferation und Migration<sup>164,165</sup>. Die komplette Aktivierung von Akt erfordert eine Phosphorylierung am Threonin 308 (Thr-308) und Serin 473 (Ser-473). Die Inaktivierung von Akt erfolgt dagegen durch die Bindung von und Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen. Dazu gehört die Protein Serin/Threonin-Phosphatase 2 PP2A, die Akt hauptsächlich am Thr-308 und zusätzlich am Ser-473 dephosphoryliert<sup>164</sup> und dadurch inaktiviert. Der in dieser Arbeit durchgeführte Kinasen-Array detektiert beide Phosphorylierungsstellen und zeigte eine signifikant geringere Menge von phosphoryliertem Akt am Ser-473 und eine tendenziell geringere Phosphorylierung an Thr-308. Dies ist möglicherweise genug, um Akt zu inaktivieren und somit die Proliferation und Migration zu hemmen. Mit der Phosphorylierung von Akt unter der Wirkung von RGS5 beschäftigten sich bereits Anger *et al.*<sup>89</sup>, indem sie durch Stimulation der Muskarinrezeptoren in COS-7 Zellen die Einbindung von RGS5 in die M<sub>2</sub>-Rezeptor/Gα<sub>i/o</sub>-bedingte Phosphorylierung von Akt untersuchten. Die Arbeitsgruppe stellte dabei für Akt eine Inhibition unter RGS5 fest. Wobei hier eine klare zelltypabhängige, receptorspezifische Inhibition von Akt durch RGS5 konstatiert wird.

Epac wird zudem während der Neointimabildung verstärkt synthetisiert, fördert dabei allerdings die Migration von GMZ. Dabei soll nicht unerwähnt bleiben, dass Epac zwar im Zusammenspiel mit PKA die Proliferation von GMZ synergistisch hemmt<sup>74</sup>, aber auf die Migration antagonistisch wirkt. Hierbei könnte eine Kompartimentalisierung und örtliche Anreicherung von cAMP, PKA und Epac durch AKAP den jeweiligen Effekt begünstigen, wie das Yokoyama *et al.*<sup>166</sup> für GMZ aus der Ratte bereits zeigten.

Zusammenfassend kann für die *in vitro* kultivierten GMZ, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ein Effekt auf die Phosphorylierung von ERK1/2, die Proliferation und die Migration, vermittelt durch die inaktive Gα<sub>i/o</sub>-Untereinheit und der damit erhöhten cAMP/PKA-Aktivität postuliert werden. Die Reduktion in der Phosphorylierung von ERK1/2 ist dabei möglicherweise erklärbar durch eine gemeinsame Wirkung von PKA/Epac und müsste in weiteren Versuchen in direktem Bezug zu RGS5 untersucht werden. *In vivo* könnte RGS5 dennoch vermutlich durch die gehemmte Aktivität der Gα<sub>q/11</sub>-



Untereinheit über den PKC/RAF/MEK/ERK-Signalweg wirken. Dies würde erneut auf einen kontextabhängigen Einfluss von RGS5 auf intrazelluläre Signalwege hindeuten.

### 7.3 Der Einfluss von RhoA auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in kultivierten, proliferierenden GMZ, die RGS5 überexprimieren, ein Anstieg von RhoA-GTP und damit in der Aktivität von RhoA nachgewiesen werden. RhoA-GTP wird hauptsächlich mit dem kontraktile Zustand von GMZ verknüpft<sup>167–169</sup>. Worth *et al.*<sup>169</sup> berichten sogar von mehreren Zellzuständen in GMZ, in denen die RhoA-Aktivität verstärkt vorliegen kann. Demnach ist RhoA während des Erlangens des synthetischen Zustands und während der Differenzierung der kultivierten GMZ in den synthetischen Zustand stärker aktiv. Sollte RGS5 diese Entwicklung begünstigen, dann würde die zusätzliche RhoA-Aktivierung einhergehen mit einem, wie bereits angenommenen, RGS5-bestimmten Phänotypwechsel zugunsten des kontraktile Phänotyps<sup>73,167–169</sup>. Wohingegen die Aktivität von RhoA, wie im Fall der Hypertonie, in ruhenden GMZ ausschlaggebend für den Wechsel des Phänotyps in den synthetischen ist<sup>113,170</sup> und somit erneut eine kontextabhängige Aktivität von RGS5 aufzeigt.

**Veränderungen auf Transkriptionsebene mit Einfluss auf RhoA:** Zum Phänotypwechsel kultivierter GMZ unter Dehnung zeigt die Transkriptomanalyse im Zusammenhang mit einer RGS5-Überexpression eine verstärkte Transkription von *ARHGEF2*, auch bekannt als *GEF-H1*. In GMZ aus der Lungenarterie konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes ARHGEF2 RhoA aktiviert und hierüber die Aktivität der RhoA Kinase ROCK beeinflusst<sup>171</sup>. ROCK wiederum vermindert die p27<sup>Kip1</sup>-Aktivität, die durch die Komplexierung mit Cdc2 oder CDK1 zur Hemmung der Proliferation beiträgt<sup>171</sup>. Allerdings ist an dieser Stelle anzumerken, dass der Kinasen-Array die Phosphorylierung von p27<sup>Kip1</sup> lediglich an Thr-198 detektiert und zwei weitere in diesem Kontext wichtige Phosphorylierungsstellen, Thr-157 und Ser-10, nicht darstellt.

Die verstärkte Expression von *ARHGEF2* korrelierte in der Transkriptomanalyse außerdem mit der verstärkten Expression von Tubulin beta 2a, welches für die Bildung von Mikrotubuli wichtig ist. Interessanterweise wird die Aktivität von ARHGEF2 verknüpft mit der Integrität der Mikrotubuli. Sobald die Mikrotubuli depolymerisieren, wird ARHGEF2 inaktiviert<sup>172</sup>. Die RhoA-bedingte zytoskelettale Ordnung ist wiederum abhängig von der Anordnung der  $\beta$ -Tubulin- und Aktin-Moleküle in GMZ. Sie spielt zudem auch innerhalb der Zellantwort nach biomechanischer Dehnung eine wichtige Rolle<sup>134,173,174</sup>. Die Erhöhung der *ARHGEF2*-Expression unter RGS5-Überexpression könnte einen Hinweis darauf geben, dass die Verstärkung der Aktivität von RhoA durch RGS5 möglicherweise über ARHGEF2 bedingt wird. Es gibt bereits Bemühungen, die Aktivierung von RhoA über GPCRs, die an die Untereinheit  $G\alpha_q$  geknüpft sind, nachzuweisen. So konnten Bodmann *et al.*<sup>175</sup> das transaktive

p63RhoGEF definieren, dass stimuliert wird durch die Ang II-aktivierte  $G\alpha_q$ -Untereinheit. P63RhoGEF kann dann RhoA-unabhängig von der Untereinheit  $G\alpha_{12/13}$  aktivieren<sup>176</sup>. Da in dieser Arbeit allerdings RGS5 überexprimiert wurde und dies scheinbar die Expression des RhoGEF-Gens *ARHGEF2* anregt, wäre es von Interesse herauszufinden, ob zunächst die Expression von *ARHGEF2* auch zu einer Synthese des entsprechenden Proteins führt. Ob RGS5 RhoA direkt über *ARHGEF2*, durch die Verstärkung einer möglichen Basisaktivität des GEFs, aktiviert oder erst über  $G\alpha_{12/13}/ARHGEF2/RhoA$ , muss weiter untersucht werden. Die Transkriptomanalyse gibt dazu lediglich einen Hinweis.

**RhoA und Migration:** Die Reduktion von RhoA-GTP durch die ADP-Ribosyltransferase C3 hatte, ebenso wie die Überexpression von RGS5, eine geringere Migration von GMZ zur Folge. Eine Inhibition der RhoA-Aktivität führte zusätzlich zu einer Inhibition der Stressfaserbildung und zur Unterbrechung der Aktin- und Tubulinanordnung in der Zelle. Dies konnte bereits in anderen Publikationen gezeigt und in dieser Arbeit bestätigt werden<sup>177</sup>. Reffay *et al.*<sup>178</sup> konnten in einer MDCK-Zelllinie (immortalisierte Madin-Darby Zellen aus der Haseniere) feststellen, dass Zellen nach C3-Behandlung und der daraus resultierenden RhoA-Inaktivierung keine Protrusionen formen. Die Aktivität von RhoA, insbesondere an Protrusionen, ist Voraussetzung für die Migration von Zellen<sup>179</sup>. Die C3-Transferase unterbindet demnach die Stressfaserbildung in kultivierten GMZ und scheint dadurch die Migration zu reduzieren. Wohingegen eine RGS5-Erhöhung die Migration ebenfalls unterbindet, die verstärkte Expression von RGS5 aber zu einer Erhöhung von RhoA führt. Zusammengefasst kann die Hemmung der Migration durch das erhöhte RGS5-Vorkommen scheinbar nicht gleichzeitig mit einer unmittelbaren RhoA-Deaktivierung einhergehen, wie es bei Behandlung mit C3-Transferase der Fall ist. Allerdings muss eine reduzierte Stressfaserbildung nicht zwingend unmittelbare Konsequenzen für die Migration von kultivierten GMZ haben. Interessanterweise greift Ridley<sup>180</sup> in einem Review zu RhoGTPasen und Migration diesen Widerspruch auf und schreibt der Inaktivierung von RhoA sowohl eine migrationsverstärkende als auch -schwächende Rolle zu. Die Migration kann in vier einzelne Schritte differenziert werden: die Ausstülpung von Lamellipodien, die Bildung einer neuen Adhäsion, die Kontraktion des Zellkörpers und die Ablösung des Zellendausläufers (s. Abbildung 19 A). RhoA spielt neben der Zellkörperkontraktion durch die Beeinflussung der Stressfaserbildung auch in der Zelladhäsion eine wichtige Rolle. Demnach kann eine reduzierte RhoA-Aktivität durch die Reduktion der Zelladhäsion die Migration erleichtern, durch die Reduktion in der Zellkörperkontraktion allerdings die Migration auch verringern<sup>180</sup>. Die funktionale Vielseitigkeit von aktivem RhoA in Zellen in Bezug zur Migration in Kombination mit einer RGS5-Überexpression erfordert daher weiterführende Untersuchungen.

**RhoA und Proliferation:** Die Proliferation von kultivierten GMZ konnte durch die Inaktivierung von RhoA durch C3-Transferase nicht beeinflusst werden. Allerdings führte eine Inaktivierung von RhoA durch C3-Transferase und eine zusätzliche Überexpression von RGS5 zu einer zusätzlichen Reduktion

der Proliferation kultivierter GMZ. Die klare Aktivierung von RhoA durch eine RGS5-Überexpression scheint demnach die anti-proliferativen Effekte unter RGS5-Überexpression gegenläufig zu beeinflussen. Scheinbar erst durch die Hemmung von RhoA durch die C3-Transferase zusätzlich zur Überexpression von RGS5, kann sich der antiproliferative Effekt durch RGS5 ungehindert zeigen. An dieser Stelle wird deutlich, dass RhoA ebenfalls auf die Proliferation kultivierter GMZ wirkt, wie es auch Zuckerbraun *et al.*<sup>181</sup> bestätigen.

Lang und Gesbert<sup>181</sup> folgern aus der Reduktion der Proliferation nach Hemmung von RhoA allerdings eine PKA-bedingte RhoA-Phosphorylierung und eine daraus resultierende Manipulation der cAMP-Aktivität in Lymphozyten. In dieser Arbeit wurde nach Behandlung von GMZ mit PTx ebenfalls eine Reduktion von RhoA-GTP beobachtet. PTx führt durch die Inaktivierung der  $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit zu einer verstärkten AC-Aktivität, die schließlich in eine erhöhte cAMP-Konzentration in kultivierten GMZ mündet (s. 5.2.2.9). Mehrere Originalarbeiten zeigen, dass die vermehrte Bildung von cAMP über die verstärkte Aktivität der Adenylatzyklase und die Aktivität von PKA eine inhibierende Wirkung auf die Bindung von GTP an RhoA durch die Phosphorylierung von RhoA am Ser-188 hat<sup>181–183</sup>. Das bestätigt wiederum die eigenen Beobachtungen, dass unter der Wirkung von PTx die RhoA-Aktivität reduziert werden konnte. Zusätzlich konnten Orth *et al.*<sup>184</sup> zeigen, dass die RhoA-Aktivität durch den Einsatz von YM-254890 nur in Abhängigkeit des  $G\alpha_{12/13}$ -Signalwegs manipuliert wird, da es sonst zur teilweisen Kompensation des YM-254890 bedingten Effekts kommt<sup>184</sup>.

#### 7.4 Der Einfluss von RGS5 auf gedehnte glatte Gefäßmuskelzellen

Als Folge von Umstrukturierungen in der Gefäßwand durch z.B. Bluthochdruck-induzierte pathophysiologische Veränderungen, kommt es zur mechanischen Krafteinwirkung auf die GMZ der *Tunica media*. Unter physiologischen Bedingungen kontrahieren GMZ zunächst und erhalten so den normalen myogenen Tonus aufrecht. Die Dehnung verstärkt sich jedoch bei einem dauerhaften Anstieg des Blutdrucks, sodass die GMZ gezwungen sind durch strukturelle Veränderungen in der Gefäßwand, wie z.B. eine verstärkte Synthese von ECM-Proteinen sowie eine verstärkte Migration und Proliferation in der Neointima, die dauerhaft erhöhte Wandspannung weitgehend zu normalisieren. Dieser Reaktion muss ein Phänotypwechsel vom ruhenden kontraktile zum aktivierten synthetischen Phänotyp der medialen GMZ zugrunde liegen (s. 4.2). Gleichzeitig steigt die RGS5-Menge in den medialen GMZ remodellierender Blutgefäße im Rahmen der Arteriogenese bzw. experimentellen Hypertonie an<sup>113,170</sup>.

**RGS5-Menge in Zellen nach Dehnung:** Um die Dehnungswirkung auf GMZ *in vitro* nachzustellen, wurden kultivierte GMZ zyklisch gedehnt (s. 5.2.3). In initialen Versuchen, in denen GMZ zu unterschiedlichen Zeitpunkten (7 und 24 Stunden) gedehnt wurden, zeigte sich, wie bereits für murine

GMZ berichtet<sup>113</sup>, auch in HUASMCs ein Anstieg der RGS5-Proteinmenge. Es wird zwar davon berichtet, dass RGS5 sehr schnell *in vitro* degradiert werden kann, allerdings scheint dieser Abbau unter Dehnung eingeschränkt zu sein<sup>114,185</sup>. Auf mRNA-Ebene scheint die Expression von RGS5 unter Dehnung und unter statischen Bedingungen stabil zu sein und nicht weiter anzusteigen. Gunaje *et al.*<sup>148</sup> berichten, in Bezug auf eine aortale glatte Gefäßmuskelzelllinie aus der Ratte, sogar von einer Reduktion der Expression von RGS5 bedingt durch die Zellkultivierung. Erst kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von RGS5 in spontan hypertensiven Ratten nicht signifikant ansteigt<sup>186</sup>. Nach einer Behandlung der kultivierten GMZ mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D zeigte sich die RGS5 mRNA-Synthese weitestgehend unverändert (Daten nicht gezeigt). Die Proteinmenge wurde durch die Behandlung durch Actinomycin D ebenfalls nicht signifikant reduziert. Sie stieg allerdings nach 24 Stunden nicht weiter an. Da Actinomycin D durch seine Interkalation in die DNA zwar die *de novo* Transkription verhindert, aber keinen Einfluss auf die bereits transkribierte RNA hat, kann die stabile mRNA weiterhin in das Protein translatiert werden. Die Stabilität der mRNA könnte demnach ein weiterer Grund dafür sein, dass mRNA-Expression und RGS5-Proteinbiosynthese durch die Behandlung mit Actinomycin D innerhalb des gewählten Untersuchungszeitraums nicht gänzlich zum Erliegen kommt. Li *et al.*<sup>187</sup> untersuchten hierfür die mRNA-Stabilität von RGS4, einem verwandten RGS-Protein aus derselben B/R4-Subfamilie, in glatten Muskelzellen aus dem Dickdarm der Ratte. Hierbei beobachteten sie eine Verlängerung der Halbwertszeit der RGS4 mRNA durch Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). IL-1 $\beta$  verhindert dabei den 3'-UTR-abhängigen Abbau der mRNA. Die Behandlung der Zellen mit Actinomycin D führte dennoch in einem Versuchsansatz, indem IL-1 $\beta$  fehlte, zu einem schnelleren Abbau der mRNA. Interessanterweise kommt IL-1 $\beta$  im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalyse in nichtgedehnten GMZ, die RGS5 überexprimieren, bei den deutlich stärker exprimierten Genprodukten vor. Ob die RGS5-mRNA vergleichbaren Stabilisierungsprozessen unterliegt, wie es für RGS4 der Fall ist, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

**Dehnungsantwort von GFP-exprimierenden Zellen:** Trotz einer Vielzahl von molekularen und strukturellen Änderungen in GMZ nach biomechanischer Dehnung zeigten die hier verwendeten kultivierten GMZ, nach adenoviraler Transduktion mit einem GFP-Vektor, nur eine schwache Reaktion auf Transkriptomebene. Demicheva *et al.*<sup>188</sup> beschreiben, dass die Dehnung von GMZ dazu führt, dass diese vom kontraktile in den synthetischen Phänotyp wechseln. In Anbetracht der Tatsache, dass die in dieser Arbeit verwendeten HUASMCs in Kultur bereits einen synthetischen Phänotyp besitzen und zusätzlich mit Viren behandelt wurden, bietet sich die Schlussfolgerung an, dass die erwartete Zellantwort dahingehend schwächer ausfällt. Obwohl hier tatsächlich nur wenige Gene in GFP-überexprimierenden HUASMCs signifikant nach Dehnung reguliert wurden, waren unter diesen dennoch einige dehnungsassoziierte Genprodukte vertreten wie der *heparin binding EGF like growth factor*, der *nuclear factor of activated T-cells 2 (NFATc2)* und das *notch regulated ankyrin repeat protein*

(NRARP). Erst kürzlich wurde *NFATC2* von Chin-Smith *et al.*<sup>189</sup> als regulatorisches, durch Dehnung induzierbares Gen postuliert, nachdem in Primärzellen aus dem Myometrium, der mittleren Gebärmutterschicht, nach sechs-stündiger Dehnung *in vitro* ebenfalls eine stärkere Genexpression von NFATc2 gefunden worden war. Dabei wurden die Zellen im Vergleich zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 15% einer Dehnungsstärke von 25% ausgesetzt. NFATc2 wird sowohl in der Kontrollgruppe unter Dehnung als auch in gedehnten Zellen unter RGS5-Überexpression stärker exprimiert. Unter zyklischer Dehnung *in vitro* berichteten bereits Morrow *et al.*<sup>190</sup> von einer Hemmung des NOTCH-Signalwegs in GMZ. Dies wird hier durch die Ergebnisse aus der *Gene Set Enrichment* Analyse bestätigt.

**Dehnungsantwort von RGS5-überexprimierenden Zellen:** Da die Kontroll-Gefäßmuskelzellen, stimuliert durch biomechanische Dehnung, nur mit wenigen signifikant exprimierten Transkripten eine eher schwache Dehnungsantwort zeigen, ist der Unterschied zu den Zellen, die RGS5 überexprimieren, deutlich erkennbar. So wird die Expression von *IL-8* oder *CXCL8* und *IL-33* nur in gedehnten Zellen, die RGS5 überexprimieren, signifikant verstärkt. IL-8 und IL-33 gehören zu den Genprodukten, welche die typische Dehnungsantwort glatter GMZ widerspiegeln sollen<sup>191–193</sup>. Somit könnte RGS5 in der Verstärkung der Dehnungsantwort von GMZ im pathophysiologischen Kontext eine Rolle spielen. GMZ wechseln bei biomechanischer Dehnung in einen synthetischen und damit proliferativen Zustand<sup>167</sup>. Direkte Hinweise darauf gibt die Transkriptomanalyse mit der Erhöhung der Expression von *CDK1* und *Ki-67*. Hierbei markiert CDK1 den Eintritt des Zellzyklus in die S-Phase und Ki-67 markiert zusätzlich den fortgeschrittenen Proliferationsstatus der Zellen. Diese Beobachtungen befinden sich im Widerspruch zu den Beobachtungen in nicht-gedehnten Zellen, die RGS5 überexprimieren. Diese Beobachtung wird zusätzlich durch die Verstärkung der Transkripte, die mit im Rahmen der GSEA mit dem Zellzyklus assoziiert werden, bestätigt. Demnach verändert der Stimulus ‚Dehnung‘ im Beisein der RGS5-Überexpression die Proliferationsfähigkeit der HUASMCs so, dass sie verstärkt synthetisch aktiv sind. Im Umkehrschluss bedeutet das erneut für RGS5, dass es im Kontext der Dehnung eine unterschiedliche Funktion in GMZ einnehmen kann. Während die GFP-überexprimierende Kontrollgruppe keinen Anstieg in der Transkriptmenge für die Zellzyklusmarker aufzeigten und somit eine grundlegende Konsequenz von Dehnung für GMZ ausließe<sup>194</sup>, war dies bei den RGS5-überexprimierenden Zellen der Fall. Dies lässt, zusammengekommen mit der stärkeren Expression von *IL-8* und *IL-33* eine verstärkte Dehnungsantwort der Zellen nach RGS5-Überexpression vermuten.

Alles in allem scheint RGS5 die Dehnungsantwort von kultivierten GMZ zu verstärken. Die Auswertung der Transkriptomwerte nach Dehnungsinduktion erlaubt zunächst eine übergeordnete Aussage dahingehend, dass RGS5 im *in vitro*-Kontext unter Dehnung eine neue Rolle als möglicher Dehnungssensibilisator einnimmt. In einem anderen Kontext, nämlich der Arteriogenese, zeigten

Arnold *et al.*<sup>113</sup>, nach Aufdehnung von kollateralen Arteriolen *in vivo* ebenfalls einen Anstieg der RGS5-Expression. Die Autoren beobachteten außerdem eine reduzierte RhoA-Aktivität und reduzierte Polymerisierung von F-Aktin in den gedehnten GMZ, in denen RGS5 fehlte<sup>113</sup>. Sie verknüpfen im Zusammenhang mit RGS5 die Sensibilität von GMZ gegenüber Dehnung mit der Aktivität von RhoA. Diese Annahme, dass RGS5 über RhoA wirken könnte, erhält seine Berechtigung dadurch, dass RhoA-abhängige Signalwege sowohl die dehnungsinduzierte Proliferation<sup>195</sup> von GMZ als auch die Signalweitergabe durch mechanische Krafteinwirkung<sup>196</sup> maßgeblich mitbestimmen. Die hier aufgeführten Transkriptomwerte müssen nun in weiteren Schritten auf mRNA- und Proteinebene validiert und funktional untersucht werden.

## 7.5 Funktionsnachweis der transgenen CreERT-SMMHC-LSL-RGS5-Maus

Bisher beschränken sich Arbeiten zur Überexpression von RGS5 auf *in vitro*-Studien. Allerdings steigt, in Hinblick auf die hier mehrfach dargelegte kontextabhängige Wirkung von RGS5, die Notwendigkeit eines *in vivo*-Modells. Damit könnte der Einfluss von RGS5 auf GMZ im Rahmen von pathophysiologischen Veränderungen, wie arteriellen Remodellierungsprozessen, untersucht werden.

**Bisherige Mausmodelle:** Die Mehrzahl der bisherigen Mausmodelle in Bezug auf die Effekte von RGS5 weisen einen Knockout von RGS5 auf, wie z.B. *rgs5*<sup>GFP/GFP</sup> und *rgs5*<sup>tm1Dgen</sup>. Zum Teil wurden diese Linien in unterschiedlichen Mausstämmen generiert wie C3HEBFe oder C57BL/6<sup>95,112</sup>. Dabei folgt die Charakterisierung dieser Tiere unter pathophysiologischen Gesichtspunkten keiner einheitlichen Aussage. So werden RGS5-defiziente Tiere mit Blick auf die Kontrolle des Blutdrucks je nach eingesetzter Messtechnik, Behandlung und Stamm als hypotensiv, hypertensiv oder gar normotensiv charakterisiert<sup>95,96,103,113</sup>. Diese Aussagen mögen zum Teil auf die unterschiedlichen Blutdruckmessmethoden zurückzuführen sein, zum Teil liegen allerdings auch unterschiedliche Deletionen des für RGS5 kodierenden Genabschnitts vor, die ebenfalls einen Einfluss auf die Beobachtungen haben könnten. Nisancioglu *et al.*<sup>95</sup> schließen nach partiellem Ersetzen des Exon 2 bis Exon 5 des RGS5-Gens durch die kodierende Sequenz zur Synthese des grün-fluoreszierenden Proteins einen Effekt auf den Phänotyp bezüglich der Blutdruckregulation der RGS5-defizienten Mäuse aus. Im Vergleich dazu verwenden Cho *et al.*<sup>103</sup> und Holobotovskyy *et al.*<sup>112</sup> Tiere, denen Exon 1 und Intron 1 bzw. nur Exon 1 aus dem *rgs5*-Gen eliminiert wurde. Es bleibt also nicht auszuschließen, dass beobachtete divergierende Effekte auf die unterschiedliche Genmanipulation zurückzuführen sind. Eine entsprechend vergleichende Diskussion des Genotyps dieser Mäuse könnte diesen Sachstand in Zukunft aufklären.

Daneben gibt es kaum Modelle zur Überexpression von RGS5. Die Gruppe um Li *et al.*<sup>159</sup> charakterisierte eine transgene Maus im Kontext der kardialen Hypertrophie und Fibrose und benutzte dafür eine Mauslinie, in der die humane cDNA der RGS5-Region dem Promotor der kardialen  $\alpha$ -MHC

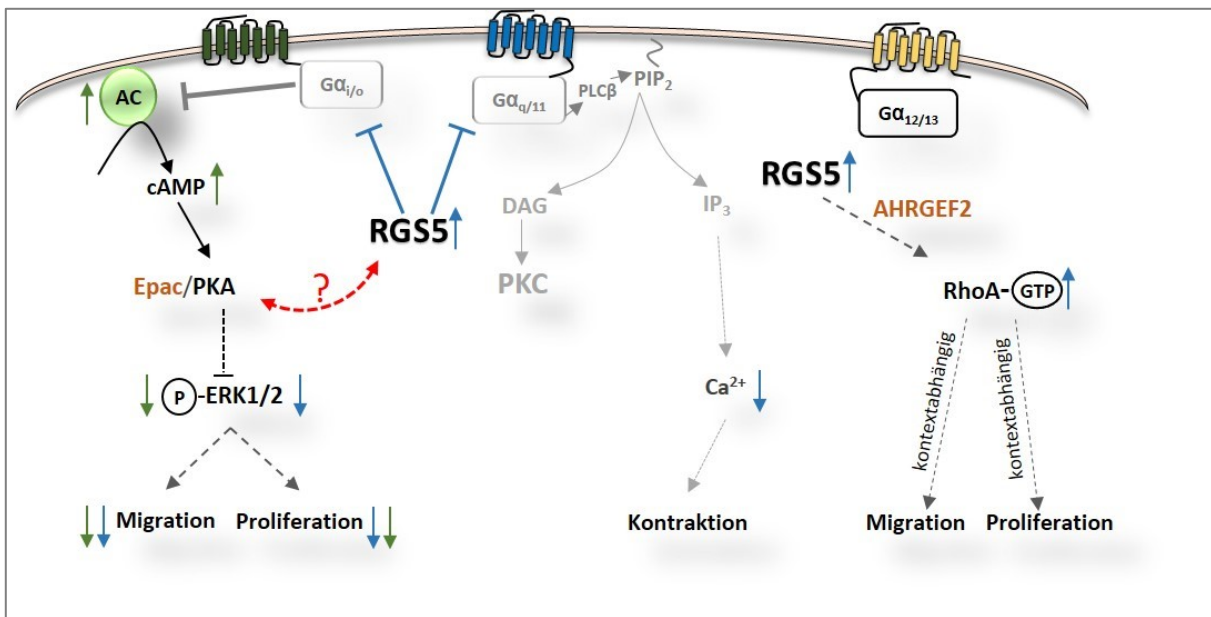
nachgeschaltet ist<sup>159</sup>. Hierdurch kommt es zur einer Herz-spezifischen Überexpression von RGS5. Aufgrund der Tatsache, dass es keine induzierbare transgene Maus ist, beginnt die Überexpression von RGS5 bereits in der embryonalen Entwicklung und kann somit nicht kontrolliert eingeschaltet werden. Außerdem birgt die Generierung einer transgenen, nicht-induzierbaren Maus die Gefahr, dass im Falle der Überexpression bereits Anpassungen im embryonalen Entwicklungsstadium erfolgten. Insbesondere, da die RGS5-Expression im Rahmen der Vaskulogenese laut Gu *et al.*<sup>93</sup> erhöht zu sein scheint, müsste das Fehlen der RGS5-Expression in Knockout-Modellen während der Entwicklung des Tieres möglicherweise aufgefangen werden. Dies gilt für konstitutive transgene Mausmodelle ebenso. Gleichzeitig erschwert der RGS5-Knockout *in vivo* den Vergleich mit den *in vitro*-Daten in dieser Arbeit, da die GMZ RGS5 in einem System überexprimieren, das zuvor keinen RGS5-Knockout hatte.

**Neues Mausmodell:** Die im Rahmen dieser Arbeit generierte, transgene Maus, enthält ein induzierbares Transgenkonstrukt. Dies hat den Vorteil, dass die Tiere zunächst ohne die Wirkung des Konstrukts charakterisiert werden können. In diesem Mausmodell wird nicht in die endogene RGS5-Expression eingegriffen. Vielmehr profitiert das Modell davon, dass Untersuchungen zum Blutdruck oder zur Remodellierung unter endogener Expression und unter induzierter Überexpression durchgeführt werden können. So können defizitbedingte Kompensationen zunächst ausgeschlossen werden. Allerdings birgt der BAC-Ansatz ebenfalls Risiken. Beil *et al.*<sup>197</sup> warnen davor, dass Nachteile des BAC-Ansatzes zum einen die unspezifische Integration des BAC-Konstrukts in das Zielgenom und zum anderen die Integration einer variablen Kopienanzahl in unbekannte Loci des Zielgenoms sind. Giraldo und Montoliu<sup>198</sup> weisen zusätzlich darauf hin, dass nicht zwangsläufig eine intakte BAC-DNA in das Zielgenom integriert wird, sondern, bedingt durch die Größe des DNA-Konstrukts, nicht-funktionale Fragmente integriert werden könnten.

Erste Hinweise auf eine funktionell erfolgreiche Expressionsinduktion zeigten sich nach Cre-Behandlung in Zellen der weiblichen Tiere nach initialen qRT-PCR-Durchgängen. Die *in vivo*-Tamoxifenbehandlung einer transgenen Maus zeigte bereits eine erfolgreiche und anhaltende Überexpression von RGS5 in den entnommenen Gefäßen, welche in den SM-MHC-reichen Gefäßabgängen der *A. mesenterica* am stärksten war. Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass das Konstrukt erfolgreich ins Mausgenom integriert wurde und nach Behandlung mit Tamoxifen in Arterien der transgenen Mäuse eine Vervielfachung der RGS5-mRNA erreicht werden konnte.

In einem Schaubild (Abbildung 42) sollen die in dieser Arbeit beobachteten Effekte in Abhängigkeit von RGS5 zusammengefasst werden. Da RGS16 bis auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und Proliferation keine signifikanten Auswirkungen auf die hier untersuchten Eigenschaften von kultivierten GMZ hatte, wird es nicht weiter aufgeführt. RGS5 konnte die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in HUASMCs reduzieren. Eine verstärkte RGS5-Synthese hatte eine Reduktion der Proliferation und Migration von HUASMCs in

Kultur zur Folge. Gleichzeitig verstärkte es die RhoA-Aktivität unter basalen Bedingungen. Die Transkriptomanalyse verschaffte durch die verstärkte Transkriptmenge des Gens *ARHGEF2* in gedehnten HUASMCs einen putativen Link zwischen einer erhöhten RGS5-Expression und einer gesteigerten RhoA-Aktivität. Die Hypothese, dass RGS5 diese Effekte in kultivierten GMZ über die Terminierung der Aktivität der G-Proteine  $G\alpha_{i/o}$  und/oder  $G\alpha_{q/11}$  erwirkt, bestätigt sich zum Teil für den  $G\alpha_{i/o}$ -abhängigen Signalweg. Diesbezüglich führt die verstärkte Aktivität der Adenylatzyklase über cAMP und PKA zu einer analogen Hemmung der Proliferation und Migration von HUASMCs und zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2. Möglicherweise geht das auf eine Interaktion von PKA



**Abbildung 42 Übersicht über die Effekte von RGS5 auf den Phänotyp kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen.** Die Effekte von RGS5 können verstärkend (Pfeilrichtung nach oben) als auch hemmend (Pfeilrichtung nach unten) sein. Grüne Pfeile geben die analogen Effekte wieder, die durch die enthemmte Aktivität der Adenylatzyklase (grüner Kreis: AC) in glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet werden konnten. In Braun angegebene Moleküle (Epac, ARHGEF2) sind mögliche Effektoren, durch die RGS5 seine gezeigte Wirkung in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen erzielen könnte. Der rote Doppelpfeil mit Fragezeichen zwischen RGS5 und PKA soll die Angriffsstelle markieren, an der dieser noch vorliegende Analogieschluss zwischen den AC-Ergebnissen und der RGS5-Überexpression aufgehoben werden kann. Nicht-durchgezogene Linien sollen verdeutlichen, dass der Signalprozess weitere, an dieser Stelle nicht gezeigte Zwischenschritte beinhaltet. Grau gefärbte Module zeigen nicht-aktive Signalwege bzw. -moleküle an.

und Epac mit cAMP zurück. Die Hemmung von RhoA durch die C3-Transferase in kultivierten HUASMCs hatte keine Auswirkung auf die Proliferation, aber eine Verminderung der Migration zur Folge. Allerdings hat die C3-Transferase-vermittelte Hemmung der RhoA-Aktivität bei zusätzlicher RGS5-Überexpression eine weitere Reduktion der Proliferation zur Folge, die zuvor bereits durch RGS5 gehemmt wurde. Demnach scheint RhoA in kultivierten HUASMCs den Proliferationseffekt von RGS5 zu konterkarieren, sobald RGS5 überexprimiert wird. Die Hemmung des  $G\alpha_{q/11}$ -Signalwegs hatte unterdessen keine Auswirkungen auf die Proliferation, Migration, ERK1/2-Phosphorylierung oder RhoA-Aktivität der glatten GMZ.



## 7.6 Limitationen und Ausblick

**Analogieschluss:** Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RGS5 in kultivierten, proliferierenden GMZ einen Einfluss auf den Phänotyp dieser hat. So wird die Proliferation und Migration der Zellen unter RGS5-Überexpression stark reduziert. Weitere Befunde legen nahe, dass dieser Einfluss über den inhibierenden Effekt von RGS5 bzw. den gehemmten  $G\alpha_{i/o}$ -Signalweg und die dadurch angetriebene Adenylatzyklase-Aktivität geschehen könnte, wie es sich z.T. auch unter der Behandlung mit PTx und gänzlich durch Forskolin-Behandlung bestätigen ließ. Die  $G\alpha_{q/11}$ -Aktivität wiederum scheint keinen Einfluss auf den Phänotyp der kultivierten, proliferierenden GMZ zu haben. Zumindest konnten die Effekte von RGS5 auf die Proliferation und Migration durch die Behandlung mit dem spezifischen  $G\alpha_{q/11}$ -Inhibitor YM-254890 nicht bestätigt werden.

Allerdings bleibt nach wie vor die Frage ungeklärt, welcher Mechanismus der RGS5-bedingten Reduktion der Proliferation und Migration und damit dem Wechsel des Phänotyps von GMZ zugrunde liegt. Schließlich greifen alle diese Prozesse als mögliche Erklärungen für die Inhibition des synthetischen Phänotyps durch RGS5. Dennoch fehlt die Verbindung der einzelnen Beobachtungen. In einem weiteren Schritt muss gezeigt werden, dass die Effekte einer möglichen  $G\alpha_{i/o}$ -Hemmung durch RGS5 über eine Blockade der Adenylatzyklase bzw. cAMP und PKA aufgehoben werden können. Bis dahin bleiben die Beobachtungen und Schlussfolgerungen lediglich Analogieschlüsse.

**Validierung einzelner Ergebnisse aus der Transkriptomanalyse:** Insbesondere Transkriptomanalysen geben einen zeitlich begrenzten und dennoch umfassenden Einblick über den Ist-Zustand der Transkription, während das Proteom zu einem früheren und späteren Zeitpunkt oder gleichzeitig verändert sein kann und funktional ins molekulare Geschehen in der Zelle eingreift. Aus der Transkriptomanalyse der dehnungsstimulierten GMZ erschließt sich im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Funktion für RGS5 als Sensibilisator der Dehnungsantwort. Die Ergebnisse aus der Transkriptomanalyse dehnungsstimulierter GMZ müssen allerdings zunächst durch qRT-PCR-Ansätze bestätigt werden und funktionell auf Proteinebene, wie z.B. durch die Untersuchung des Proliferationsverhaltens gedehnter GMZ, validiert werden, um daraus belastbare Schlüsse ziehen zu können.

**Funktionelle Validierung der transgenen Maus:** Durch die fehlende Überprüfung der *in vitro* Ergebnisse im *in vivo*-Kontext im Rahmen dieser Arbeit ist die Relevanz der hier gezeigten Ergebnisse zunächst noch limitiert. Aus diesem Grund und aufgrund der zahlreichen Implikationen in unterschiedliche Signalwege ist es von elementarer Bedeutung für weiterführende Forschungsarbeiten die Überexpression von RGS5 speziell in GMZ *in vivo* nachzuverfolgen. Diese kann nun anhand der im Rahmen dieser Arbeit generierten transgenen CreERT-SMMHC-LSL-RGS5-Maus in zukünftigen Versuchen untersucht werden, nachdem die transgene Maus *in vivo* ebenfalls funktionell

---

validiert wurde. Als konkreter Schritt ist in diesem Kontext der Nachweis der RGS5-Überexpression auf Proteinebene *in vivo* unerlässlich. Nach der erfolgreichen Validierung werden Blutdruckmessungen nach der Induktion der RGS5-Überexpression folgen. Im *in vivo*-Kontext kann eine Senkung des Blutdrucks erwartet werden, da die RGS5-Überexpression eine verstärkte GAP-Funktion und damit eine gehemmte  $G\alpha_{q/11}$ -Aktivität zur Folge haben müsste. Das würde in eine gehemmte Kontraktion von GMZ münden, was dann zur Blutdrucksenkung führen könnte. Ein Neointimamodell in Mäusen, wie es Daniel *et al.*<sup>114</sup> beschreiben, könnte aufzeigen, dass die RGS5-Überexpression die übermäßige Proliferation von GMZ im Kontext der Neointimabildung unterbindet und damit diese selbst reduziert. Ähnliches berichteten die Autoren bereits nach adenoviraler RGS5-Überexpression. Allerdings hätte das Mausmodell dieser Arbeit den Vorteil, dass mögliche Nebeneffekte durch die Behandlung mit Viren ausgeschlossen wären. Darüber hinaus stehen die Tiere für weitere Forschungsansätze zur Verfügung, insbesondere in Hinblick auf RGS5 als möglicher Verstärker biomechanischer Dehnungsantworten in Kombination mit einer erhöhten RhoA-Aktivität.

## 8 Danksagung

Prof. Dr. Markus Hecker möchte ich meinen zutiefst ehrlichen Dank dafür aussprechen, dass ich meine Promotion in der Herz- und Kreislaufphysiologie durchführen durfte. Daneben möchte ich ihm dafür danken, dass er mir mit Ratschlägen und professioneller Unterstützung nicht nur während meiner *TAC-Meetings* zur Seite stand.

Prof. Dr. Thomas Korff gilt mein besonderer und herzlicher Dank für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Promotion. Zudem danke ich ihm dafür, dass er mich unermüdlich herausgefordert hat und mich dadurch über meine Grenzen hinauswachsen ließ. Mit guten Ratschlägen, interessanten Gegenfragen und somit anregenden Diskussionen hast Du mich zur Wissenschaftlerin ausgebildet. Dank Deines dir eigenen Forschungsenthusiasmus und deiner Motivation gab es eine offene Tür und ein offenes Ohr für alle Fragen zu jeder Zeit. Das möchte ich für meinen eigenen Weg von Dir übernehmen und weiterführen.

Herrn Prof. Dr. Mark Freichel, Herrn Dr. Ralf Bischoff und Herrn Prof. Dr. Stephan Frings möchte ich für die Begutachtung meiner Arbeit und ihre Mühen während meines Rigorosums danken. Für Herrn Prof. Freichel und Herrn Dr. Ralf Bischoff möchte ich außerdem für ihre zusätzliche Unterstützung und ihre Ratschläge während meiner *TAC-Meetings* danken.

Herrn Prof. Dr. Rainer Fink danke ich insbesondere für das Interesse an meiner Arbeit und für anregende Diskussionen, die über den Tellerrand hinaus geführt haben.

Ich danke allen Kooperationspartnern für die wissenschaftliche und technische Unterstützung während meiner Arbeit: Prof. Thomas Wieland, Prof. Nina Wettschureck, Prof. Stefan Offermanns und Dr. Carsten Sticht.

Mein herzlicher Dank gilt insbesondere meinen Kollegen, die mir jeden Tag aufs Neue eine anregende, aber auch lustige und dadurch angenehme Zeit bereitet haben. Dank eurer Freude und eurem fortwährenden Zuspruch habt ihr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders erwähnen möchte ich Cordula Rumig, Carla Sens-Albert, Ivelina Urban, Laura-Inés Böhler, Cheryl Sultan, Taslima Nahar, Tanja Wiedenmann, Sebastian Lont, Christoph Hangel, Felicia Feiler, Renate Cattaruzza und Franziska Mohr.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Korff für ihren unermüdlichen Rat und das angenehme Arbeitsklima bedanken: Für die Antwort auf alle technischen Fragen, Tipps und Tricks möchte ich mich ausdrücklich bei Gudrun Scheib, Maria Harlacher und Yvonne Feuchter bedanken.

Dr. Anja Feldner und Dr. Hannes Schröder danke ich für die professionelle Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen.

Ganz besonders herzlich danke ich Dr. Caroline Arnold für die umfangreiche professionelle Betreuung und persönliche Bereicherung während der gesamten Promotionszeit. Dank Deiner Unterstützung innerhalb und außerhalb meiner Promotionszeit konnte ich so einige Fragezeichen mit einem Ausrufezeichen versehen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen tollen Kolleginnen Maren Zappe, Hanna Kuk und Anne-Sophie Ernst für die Ablenkung und Motivation, aber auch Unterstützung und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre während der Promotionszeit.

Anerkennen möchte ich auch die Vorarbeit aller grandiosen WissenschaftlerInnen, ohne deren geistige Genialität unsere Arbeit auf dem heutigen Niveau gar nicht möglich wäre.

Tief verbunden bin ich meiner Familie und meinen Freunden für die nächtlichen Korrekturarbeiten, ihre endlose Geduld, Motivation und ihr Vertrauen in mich – Danke.

Unendlich dankbar bin ich meiner Mutter für ihre unermüdliche Unterstützung und ihren beispiellosen Glauben an die Bildung, wodurch sie mir das Studium und die Promotion ermöglicht hat. Ihr widme ich diese Arbeit.

*Benim en büyük kuvvetim, evden çıkarken arkamdan dua eden bir annem olması.*

## 9 Literaturverzeichnis

1. Bondke Persson, A. et al. Physiologie. (Georg Thieme Verlag, 2014). doi:10.1055/b-002-98019
2. Schmidt, R. F. & Lang, F. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. (2007).
3. Menche, N. Biologie, Anatomie, Physiologie. (Springer Heidelberg, 2010).
4. Gay, Rüdiger; Rothenburger, A. Taschenatlas Physiologie. (2012).
5. Bergers, G. & Song, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro. Oncol.* **7**, 452–64 (2005).
6. Menche, N. Physiologie des Menschen. (Springer Heidelberg, 2010).
7. Wynne, B. M. et al. Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *J. Am. Soc. Hypertens.* **3**, 84–95 (2009).
8. Webb, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ.* **27**, 201–206 (2003).
9. Van Varik, B. J. et al. Mechanisms of arterial remodeling: Lessons from genetic diseases. *Front. Genet.* **3**, 1–10 (2012).
10. Mulvany, M. J. Vascular remodelling of resistance vessels can we define this? *Cardiovasc. Res.* **41**, 9–13 (1999).
11. Castorena-Gonzalez, J. A. et al. Mechanisms of the inward remodeling process in resistance vessels: Is the actin cytoskeleton involved? *Microcirculation* **21**, 219–229 (2014).
12. Fleenor, B. S. & Berrones, A. J. Arterial stiffness. 15–27 (2015). doi:10.1007/978-3-319-24844-8
13. Mayet, J. & Hughes, A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart* **89**, 1104–1109 (2003).
14. Sparks, M. A. et al. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr. Physiol.* **4**, 1201–1228 (2014).
15. Renna, N. F. et al. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int. J. Hypertens.* **2013**, (2013).
16. Mulvany, M. J. et al. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. *Circ. Res.* **43**, 854–864 (1978).
17. Rewerk, S. et al. Durch die Augen von Laplace: Die Rolle der Wandspannung bei Varikosis. *Phlebologie* **41**, 61–67 (2012).
18. Korshunov, V. A. et al. Vascular remodeling: Hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1722–1728 (2007).
19. Mulvany, M. J. Small artery remodelling in hypertension. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **110**, 49–55 (2012).
20. Bund, S. J. & Lee, R. M. K. W. Arterial structural changes in hypertension: A consideration of

- 
- methodology, terminology and functional consequence. *J. Vasc. Res.* **40**, 547–557 (2003).
21. Hou, G. et al. Type VIII collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury. *Am. J. Pathol.* **156**, 467–476 (2000).
  22. Newby, A. C. & Zaltsman, A. B. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J. Pathol.* **190**, 300–309 (2000).
  23. Zou, Y. et al. Gαq G proteins modulate MMP-9 gelatinase during remodeling of the murine femoral artery. *J. Surg. Res.* **181**, 32–40 (2013).
  24. Miano, J. M. et al. Localization of Fos and Jun proteins in rat aortic smooth muscle cells after vascular injury. *Am. J. Pathol.* **142**, 715–724 (1993).
  25. Serrano, M. C. et al. Poly(diols-co-citrate)s as novel elastomeric perivascular wraps for the reduction of neointimal hyperplasia. *Macromol. Biosci.* **11**, 700–709 (2011).
  26. Owens, G. K. et al. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological Rev.* **84**, 767–801 (2004).
  27. Mack, C. P. C. C. P. Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1495–1505 (2011).
  28. Zhang, Y. nan et al. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the ‘normal region’ of aorta from atherosclerosis patients is regulated by miR-145. *J. Cell. Mol. Med.* **20**, 1049–1061 (2016).
  29. Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* **75**, 487–517 (1995).
  30. Johnson, J. L. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, e35 LP-e44 (2011).
  31. Schuliga, M. Smooth muscle and extracellular matrix interactions in health and disease. in *Muscle Cell and Tissue* (ed. Sakuma, K.) 359–391 (InTech, 2015). doi:<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68547>
  32. Schuliga, M. Smooth muscle and extracellular matrix interactions in health and disease. in *Muscle cell and tissue* (ed. Sakuma, K.) (InTech, 2015).
  33. Martinez-Lemus, Luis A.; Galinanes, E. L. Matrix metalloproteinases and small artery remodeling. *Drug Discov. Today Dis. Model.* **27**, 2032–2043 (2012).
  34. Milewicz, D. M. et al. Genetic variants promoting smooth muscle cell proliferation can result in diffuse and diverse vascular diseases: evidence for a hyperplastic vasculomyopathy. *Genet. Med.* **12**, 196–203 (2010).
  35. Rensen, S. S. M. et al. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth. Heart J.* **15**, 100–8 (2007).

- 
36. Davis-Dusenbery, B. N. et al. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2370–2377 (2011).
  37. Wang, Z. et al. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7129–34 (2003).
  38. Liu, Z. P. et al. Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and Myocardin. *Dev. Cell* **9**, 261–270 (2005).
  39. Salmon, M. et al. Cooperative binding of KLF4, pELK-1, and HDAC2 to a G/C repressor element in the SM22a promoter mediates transcriptional silencing during SMC phenotypic switching in vivo. *Circ. Res.* **111**, 685–696 (2012).
  40. Pipes, G. C. T. et al. The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *GENES Dev.* **20**, 1545–1556 (2006).
  41. Cordes, K. R. et al. MiR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* **460**, 705–710 (2009).
  42. Joshi, S. R. et al. MicroRNA regulation of smooth muscle phenotype. *Mol. Cell. Pharmacol.* **4**, 1–16 (2012).
  43. Zhang, W. et al. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **12**, 9–18 (2002).
  44. Roberts, P. J. & Der, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291–3310 (2007).
  45. Valko, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
  46. Cowan, K. J. & Storey, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J. Exp. Biol.* **206**, 1107–15 (2003).
  47. Izawa, Y. et al. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1)/extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is involved in platelet-derived growth factor (PDGF)-induced vascular smooth muscle cell migration. *Hypertens. Res.* **30**, 1107–1117 (2007).
  48. Cargnello, M. & Roux, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 50–83 (2011).
  49. Hendriks-Balk, M. C. et al. Regulation of G protein-coupled receptor signalling: Focus on the cardiovascular system and regulator of G protein signalling proteins. *Eur. J. Pharmacol.* **585**, 278–291 (2008).
  50. Tadevosyan, A. et al. G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *J. Physiol.* **590**, 1313–1330 (2012).
  51. Van Biesen, T. et al. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **17**, 698–

- 714 (1996).
52. Wettschureck, N. & Offermanns, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Rev.* **85**, 1159–1204 (2005).
  53. Klabunde, R. E. Vascular smooth muscle contraction and relaxation. *Cardiovascular Physiology Concepts Second Edition* (2012). Available at: <http://cvphysiology.com/Blood Pressure/BP026>. (Accessed: 20th August 2017)
  54. Sadana, R. & Dessauer, C. W. Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: Insights from knockout and overexpression studies. *NeuroSignals* **17**, 5–22 (2009).
  55. Siehler, S. Regulation of RhoGEF proteins by G 12/13-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 41–49 (2009).
  56. Scheerer, P. & Sommer, M. E. Structural mechanism of arrestin activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **45**, 160–169 (2017).
  57. Xiao, K. & Sun, J. Elucidating structural and molecular mechanisms of  $\beta$ -arrestin-biased agonism at GPCRs via MS-based proteomics. *Cell. Signal.* 0–1 (2017). doi:10.1016/j.cellsig.2017.09.013
  58. Murthy, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 345–374 (2006).
  59. Khalil, R. Protein kinase C. in *Regulation of Vascular Smooth Muscle Function* (eds. Granger, D. N. & Granger, J. P.) (Morgan & Claypool Life Sciences, 2010).
  60. Seasholtz, T. M. et al. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ. Res.* **84**, 1186–1193 (1999).
  61. Wirth, A. et al. G12-G13–LARG–mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat. Med.* **14**, 64–68 (2008).
  62. Gohla, A. & Offermanns, S. Role for G 12 /G 13 in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ. Res.* **87**, 221–227 (2000).
  63. Guilluy, C. et al. The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat. Cell Biol.* **13**, 724–729 (2011).
  64. Siderovski, D. P. & Willard, F. S. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 51–66 (2005).
  65. McCudden, C. R. et al. G-protein signaling: Back to the future. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 551–577 (2005).
  66. Moon, S. Y. & Zheng, Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* **13**, 13–22 (2003).
  67. Momotani, K. & Somlyo, A. V. P63RhoGEF: A new switch for Gq-mediated activation of smooth muscle. *Trends Cardiovasc. Med.* **22**, 122–127 (2012).
  68. Dumaz, N. & Marais, R. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling



- pathways. *FEBS J.* **272**, 3491–3504 (2005).
69. Gerits, N. et al. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. *Cell. Signal.* **20**, 1592–1607 (2008).
70. Stork, P. J. S. & Schmitt, J. M. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* **12**, 258–266 (2002).
71. Intengan, H. D. & Schiffrin, E. L. Vascular remodeling in hypertension. *Hypertension* **38**, 581–587 (2001).
72. Xie, C. et al. Smooth muscle cell differentiation in vitro: Models and underlying molecular mechanisms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1485–1494 (2011).
73. Althoff, T. F. et al. Procontractile G protein-mediated signaling pathways antagonistically regulate smooth muscle differentiation in vascular remodeling. *J. Exp. Med.* **209**, 2277–2290 (2012).
74. Hewer, R. C. et al. PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**, 87–98 (2011).
75. Indolfi, C. et al. 8-Chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointima formation induced by balloon injury in vivo. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 288–293 (2000).
76. Cass, L. a et al. Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5882–91 (1999).
77. Mifune, M. et al. Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. **1**, (2000).
78. Rodriguez-Vita, J. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor- $\beta$ , increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **97**, 125–134 (2005).
79. Althoff, T. F. & Offermanns, S. G-protein-mediated signaling in vascular smooth muscle cells — implications for vascular disease. *J. Mol. Med.* **93**, 973–981 (2015).
80. Hollinger, S. & Hepler, J. R. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* **54**, 527–559 (2002).
81. Hepler, J. R. Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 376–382 (1999).
82. Bansal, G. et al. R4 RGS proteins: Regulation of G-protein signaling and beyond. *Pharmacol. Ther.* **116**, 473–495 (2007).
83. Ladds, G. et al. Differential effects of RGS proteins on G $\alpha_q$  and G $\alpha_{11}$  activity. *Cell. Signal.* **19**, 103–113 (2007).
84. Furuya, M. et al. Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour

- vasculature of human renal cell carcinoma. *J. Pathol.* **203**, 551–8 (2004).
85. Beadling, C. et al. Regulators of G protein signaling exhibit distinct patterns of gene expression and target G protein specificity in human lymphocytes. *J. Immunol.* **162**, 2677–82 (1999).
  86. Johnson, E. N. et al. RGS16 inhibits signalling through the G alpha 13-Rho axis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1095–1103 (2003).
  87. Slep, K. C. et al. Molecular architecture of Gα13 and the structural basis for RGS16-mediated deactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6243–8 (2008).
  88. Kimble, A. & Bosch, D. Regulators of G-protein signaling and their G alpha substrates : promises and challenges in their use as drug discovery targets. *Pharmacol. Rev.* **63**, 728–749 (2011).
  89. Anger, T. et al. RGS protein specificity towards Gq- and Gi/o-mediated ERK 1/2 and Akt activation, in vitro. *J. Biochem. Mol. Biol.* **40**, 899–910 (2007).
  90. Vries, L. De et al. The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 235–71 (2000).
  91. Tu, Y. et al. Palmitoylation of a conserved cysteine in the regulator of G protein signaling (RGS) domain modulates the GTPase-activating activity of RGS4 and RGS10. *J. Biol. Chem.* **274**, 38260–38267 (1999).
  92. Osterhout, J. L. et al. Palmitoylation regulates regulator of G-protein signaling (RGS) 16 function. *J. Biol. Chem.* **278**, 19309–19316 (2003).
  93. Gu, S. et al. RGS proteins: identifying new GAPs in the understanding of blood pressure regulation and cardiovascular function. *Clin. Sci. (Lond).* **116**, 391–399 (2009).
  94. Heximer, S. P. et al. Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **111**, 445–452 (2003).
  95. Nisancioglu, M. H. et al. Generation and characterization of rgs5 mutant mice. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2324–2331 (2008).
  96. Holobotovskyy, V. et al. Regulator of G protein signaling 5 is a determinant of gestational hypertension and preeclampsia. *Sci. Transl. Med.* **7**, 290ra88 (2015).
  97. Qiagen. Chip-basierte qPCR Primerläufe. Transkriptionsfaktor Bindestellen RGS2. Available at: [http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?factor=Over+200+TF&species\\_id=0&ninfo=n&ngene=n&nfactor=y&gene=RGS2](http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?factor=Over+200+TF&species_id=0&ninfo=n&ngene=n&nfactor=y&gene=RGS2). (Accessed: 8th July 2017)
  98. Rocío Arana, M. et al. Coordinated induction of GST and MRP2 by cAMP in Caco-2 Cells. Role of protein kinase A signaling pathway and toxicological relevance. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **287**, 178–190 (2015).
  99. Buckbinder, L. et al. The p53 tumor suppressor targets a novel regulator of G protein signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7868–7872 (1997).
  100. Seki, N. et al. Isolation, tissue expression, and chromosomal assignment of human RGS5, a novel

- G-protein signaling regulator gene. *J. Hum. Genet.* **43**, 202–205 (1998).
101. Manzur, M. & Ganss, R. Regulator of G protein signaling 5: A new player in vascular remodeling. *Trends Cardiovasc. Med.* **19**, 26–30 (2009).
  102. Wang, X. et al. RGS5, RGS4, and RGS2 expression and aortic contractility are dynamically co-regulated during aortic banding-induced hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **44**, 539–550 (2008).
  103. Cho, H. et al. Rgs5 targeting leads to chronic low blood pressure and a lean body habitus. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2590–2597 (2008).
  104. Xu, Z. et al. Overexpression of the regulator of G-protein signaling 5 reduces the survival rate and enhances the radiation response of human lung cancer cells. *Oncol. Rep.* **33**, 2899–2907 (2015).
  105. Adams, L. D. et al. A comparison of aorta and vena cava medial message expression by cDNA array analysis identifies a set of 68 consistently differentially expressed genes, all in aortic media. *Circ. Res.* **87**, 623–31 (2000).
  106. Li, J. et al. Regulator of G protein signaling 5 marks peripheral arterial smooth muscle cells and is downregulated in atherosclerotic plaque. *J. Vasc. Surg.* **40**, 519–528 (2004).
  107. Adams, L. D. et al. Expression profiling identifies smooth muscle cell diversity within human intima and plaque fibrous cap: Loss of RGS5 distinguishes the cap. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 319–325 (2006).
  108. Zhang, H. et al. Origin-specific epigenetic program correlates with vascular bed-specific differences in Rgs5 expression. *FASEB J.* **26**, 181–91 (2012).
  109. Zhou, J. et al. Characterization of RGS5 in regulation of G protein-coupled receptor signaling. *Life Sci.* **68**, 1457–1469 (2001).
  110. Wang, Q. et al. Receptor-selective effects of endogenous RGS3 and RGS5 to regulate mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 24949–58 (2002).
  111. Moroi, K. et al. Phosphorylation of Ser166 in RGS5 by protein kinase C causes loss of RGS function. *Life Sci.* **81**, 40–50 (2007).
  112. Holobotovskyy, V. et al. Regulator of G-protein signaling 5 controls blood pressure homeostasis and vessel wall remodeling. *Circ. Res.* **112**, 781–791 (2013).
  113. Arnold, C. et al. RGS5 promotes arterial growth during arteriogenesis. *EMBO Mol. Med.* **6**, 1–15 (2014).
  114. Daniel, J. M. et al. Regulator of G-protein signaling 5 prevents smooth muscle cell proliferation and attenuates neointima formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 317–327 (2016).
  115. He, T. C. et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2509–14 (1998).

- 
116. Siehler, S. & Manning, D. R. Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1582**, 94–99 (2002).
  117. Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15545–15550 (2005).
  118. Melé, M. et al. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science (80-. ).* **348**, 660–665 (2015).
  119. Project, T. G. et al. A novel approach to high-quality postmortem tissue procurement. **13**, 311–319 (2015).
  120. The Broad institute. GTEx Portal\_2017. The broad institute of MIT and Harvard. (2017). Available at: <https://www.gtexportal.org/home/>. (Accessed: 20th March 2017)
  121. Mortazavi, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**, 621–628 (2008).
  122. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
  123. Johnson, M. Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual. *Trends in Genetics* **2**, 298 (1986).
  124. Song, X. et al. MiRNAs and lncRNAs in vascular injury and remodeling. *Sci. China Life Sci.* **57**, 826–835 (2014).
  125. Davis, R. et al. TNF-alpha-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells involves Raf-1-mediated inactivation of Rb and transcription of E2F1-regulated genes. *Cell Cycle* **11**, 109–118 (2012).
  126. Ruehl, M. et al. The elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 38537–38543 (2005).
  127. Zhou, M. & Veenstra, T. D. Proteomic analysis of protein complexes. *Proteomics* **7**, 2688–2697 (2007).
  128. Hutcheson, R. et al. MicroRNA-145 restores contractile vascular smooth muscle phenotype and coronary collateral growth in the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 727–736 (2013).
  129. Gerthoffer, W. T. Migration of airway smooth muscle cells. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **5**, 97–105 (2008).
  130. Korff, T. et al. MiR-663 and the miRaculous vascular smooth muscle phenotypic switch. *Circ. Res.* **113**, 1102–1105 (2013).
  131. Perrin, B. J. & Ervasti, J. M. The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton* **67**,

- 630–634 (2010).
132. Etienne-Manneville, S. Actin and microtubules in cell motility: Which one is in control? *Traffic* **5**, 470–477 (2004).
  133. Oishi, A. et al. Regulation of RhoA signaling by the cAMP-dependent phosphorylation of RhoGDI?? *J. Biol. Chem.* **287**, 38705–38715 (2012).
  134. Dubash, A. D. et al. A novel role for Lsc/p115 RhoGEF and LARG in regulating RhoA activity downstream of adhesion to fibronectin. *J. Cell Sci.* **120**, 3989–3998 (2007).
  135. Park, J. M. et al. Stretch activates heparin-binding EGF-like growth factor expression in bladder smooth muscle cells Stretch activates heparin-binding EGF-like growth factor expression in bladder smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **275**, 1247–1254 (2010).
  136. Douglas, M. E. & Diffley, J. F. X. Recruitment of Mcm10 to sites of replication initiation requires direct binding to the minichromosome maintenance (MCM) complex. *J. Biol. Chem.* **291**, 5879–5888 (2016).
  137. Chang, S. et al. Phenotypic modulation of primary vascular smooth muscle cells by short-term culture on micropatterned substrate. *PLoS One* **9**, (2014).
  138. Kesavan, R. et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by Gentiana lutea root extracts. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
  139. Duronio, R. J. & Xiong, Y. Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, 1–12 (2013).
  140. Akiyama, T. et al. Phosphorylation of the retinoblastoma protein by cdk2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7900–7904 (1992).
  141. Ardila, D. C. et al. TGFβ2 differentially modulates smooth muscle cell proliferation and migration in electrospun gelatin-fibrinogen constructs. *Biomaterials* **37**, 164–73 (2015).
  142. Majesky, M. W. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1248–1258 (2007).
  143. Chen, P. Y. et al. Smooth muscle FGF/TGFβ cross talk regulates atherosclerosis progression. *EMBO Mol Med* **8**, 712–728 (2016).
  144. Iaconetti, C. et al. Non-coding RNAs: The ‘dark matter’ of cardiovascular pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, (2013).
  145. Cheng, Y. et al. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ. Res.* **105**, 158–166 (2009).
  146. Boettger, T. et al. Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J. Clin. Invest.* **119**, 2634–2647 (2009).
  147. Beamish, J. A. et al. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* **16**, 467–491 (2010).

- 
148. Gunaje, J. J. et al. PDGF-dependent regulation of regulator of G protein signaling-5 expression and vascular smooth muscle cell functionality. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **301**, 478–489 (2011).
  149. Sandison, M. E. et al. The transition of smooth muscle cells from a contractile to a migratory, phagocytic phenotype: direct demonstration of phenotypic modulation. *J. Physiol.* **594**, 6189–6209 (2016).
  150. Tanski, W. J. et al. Role of Gαq in smooth muscle cell proliferation. *J. Vasc. Surg.* **39**, 639–644 (2004).
  151. Billington, C. K. & Penn, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir. Res.* **4**, 2 (2003).
  152. Liang, G. et al. RGS16 inhibits breast cancer cell growth by mitigating phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J. Biol. Chem.* **284**, 21719–21727 (2009).
  153. Mendoza, M. C. et al. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 320–328 (2011).
  154. Zhang, Y. et al. RGS16 attenuates Gαq-dependent p38 mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* **274**, 2851–2857 (1999).
  155. Hiol, A. et al. Palmitoylation regulates regulators of G-protein signaling (RGS) 16 function. *J. Biol. Chem.* **278**, 19301–19308 (2003).
  156. Karim, Z. A. et al. CXCL12 regulates platelet activation via the regulator of G-protein signaling 16. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 314–321 (2016).
  157. Watson, L. et al. JNK and c-Jun but not ERK and c-Fos are associated with sustained neointima-formation after balloon injury. *Eur. J. Clin. Invest.* **30**, 11–17 (2000).
  158. Marx, S. O. et al. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circ. Cardiovasc. Interv.* **4**, 104–111 (2011).
  159. Li, H. et al. Regulator of G protein signaling 5 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis during biomechanical stress of pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 13818–13823 (2010).
  160. Goldsmith, Z. G. & Dhanasekaran, D. N. G Protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**, 3122–3142 (2007).
  161. Musa, N. L. et al. Forskolin inhibits cyclin D1 expression in cultured airway smooth- muscle cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **20**, 352–358 (1999).
  162. Hong, K. et al. A novel Epac-Rap-PP2A signaling module controls cAMP-dependent Akt regulation. *J. Biol. Chem.* **283**, 23129–23138 (2008).
  163. Dodge-Kafka, K. L. et al. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* **437**, 574–578 (2005).
  164. Kuo, Y. C. et al. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival

- by the B55 $\alpha$  regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J. Biol. Chem.* **283**, 1882–1892 (2008).
165. Mourani, P. M. et al. Unique, highly proliferative growth phenotype expressed by embryonic and neointimal smooth muscle cells is driven by constitutive Akt, mTOR, and p70S6K signaling and is actively repressed by PTEN. *Circulation* **109**, 1299–1306 (2004).
  166. Yokoyama, U. et al. Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **295**, H1547–H1555 (2008).
  167. Halka, A. T. et al. The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro. *Cardiovasc. Pathol.* **17**, 98–102 (2008).
  168. Peyton, S. R. et al. The effects of matrix stiffness and RhoA on the phenotypic plasticity of smooth muscle cells in a 3-D biosynthetic hydrogel system. *Biomaterials* **29**, 2597–2607 (2008).
  169. Worth, N. F. et al. Rho expression and activation in vascular smooth muscle cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **59**, 189–200 (2004).
  170. Arnold, C. et al. Hypertension-evoked RhoA activity in vascular smooth muscle cells requires RGS5. *FASEB J.* fj.201700384RR (2017). doi:10.1096/fj.201700384RR
  171. Yu, L. et al. Heparin inhibits pulmonary artery smooth muscle cell proliferation through guanine nucleotide exchange factor-H1/RhoA/Rho kinase/p27. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 524–530 (2011).
  172. Birkenfeld, J. et al. Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis? *Trends Cell Biol.* **18**, 210–219 (2008).
  173. Tang, D. D. & Gerlach, B. D. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir. Res.* **18**, 54 (2017).
  174. Burridge, K. & Wittchen, E. S. The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J. Cell Biol.* **200**, 9–19 (2013).
  175. Bodmann, E.-L. et al. Dynamics of G $\alpha$  q -protein–p63RhoGEF interaction and its regulation by RGS2. *Biochem. J* **458**, 131–140 (2014).
  176. Lutz, S. et al. The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J. Biol. Chem.* **280**, 11134–11139 (2005).
  177. Hirshman, C. a & Emala, C. W. Actin reorganization in airway smooth muscle cells involves Gq and Gi-2 activation of Rho. *Am. J. Physiol.* **277**, L653–61 (1999).
  178. Reffay, M. et al. Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nat. Cell Biol.* **16**, 217–223 (2014).
  179. Friedl, P. et al. Rho-directed forces in collective migration. *Nat. Cell Biol.* **16**, 208–210 (2014).
  180. Ridley, A. J. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* **114**, 2713–2722 (2001).

- 
181. Lang, P. & Gesbert, F. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* **15**, 510–519 (1996).
  182. Davis, A. et al. Functional significance of protein kinase A activation by endothelin-1 and ATP: Negative regulation of SRF-dependent gene expression by PKA. *Cell. Signal.* **15**, 597–604 (2003).
  183. Laudanna, C. et al. Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and Integrin-dependent elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and Integrin-dependent leukocyte chemoattractants. *J. Biol. Chem.* **272**, 24141–24145 (1997).
  184. Orth, J. H. C. et al. Pasteurella multocida toxin-induced activation of RhoA is mediated via two families of G $\alpha$  proteins, G $\alpha_q$  and G $\alpha_{12/13}$ . *J. Biol. Chem.* **280**, 36701–36707 (2005).
  185. Lee, M. J. et al. RGS4 and RGS5 are in vivo substrates of the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15030–15035 (2005).
  186. Hong, K. et al. Angiotensin II type 1 receptor mechanoactivation involves RGS5 (regulator of G protein signaling 5) in skeletal muscle arteries. *Hypertension* **70**, 1264 LP-1272 (2017).
  187. Li, F. et al. RNA-binding protein HuR regulates RGS4 mRNA stability in rabbit colonic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C1418-29 (2010).
  188. Demicheva, E. et al. Stretch-induced activation of the transcription factor activator protein-1 controls monocyte chemoattractant protein-1 expression during arteriogenesis. *Circ. Res.* **103**, 477–484 (2008).
  189. Chin-Smith, E. C. et al. Nuclear factor of activated T-cell isoform expression and regulation in human myometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **13**, 83 (2015).
  190. Morrow, D. et al. Cyclic strain inhibits notch receptor signaling in vascular smooth muscle cells in vitro. *Circ. Res.* **96**, 567–575 (2005).
  191. Kakkar, R. et al. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 6941–6948 (2012).
  192. Kim, H. Y. et al. Upregulation of interleukin-8/CXCL8 in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.* **31**, 515–23 (2008).
  193. Loudon, J. A. Z. et al. Mechanical stretch of human uterine smooth muscle cells increases IL-8 mRNA expression and peptide synthesis. *Mol. Hum. Reprod.* **10**, 895–9 (2004).
  194. Haga, J. H. et al. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *J Biomech* **40**, 947–960 (2007).
  195. Liu, W. F. et al. Cadherins, RhoA, and Rac1 are differentially required for stretch-mediated proliferation in endothelial versus smooth muscle cells. *Circ. Res.* **101**, (2007).
  196. Numaguchi, K. et al. Mechanotransduction of rat aortic vascular smooth muscle cells requires RhoA and intact actin filaments. *Circ. Res.* **85**, 5–11 (1999).
  197. Beil, J. et al. Is BAC transgenesis obsolete? State of the art in the era of designer nucleases. *J.*



- Biomed. Biotechnol.* **2012**, 1–6 (2012).
198. Giraldo, P. & Montoliu, L. Size matters: Use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Research* (2001). doi:10.1023/A:1008918913249
199. Schünke, Michael; Schulte, E. S. U. Prometheus Lernatlas. (Thieme Verlagsgruppe, 2011).
200. Roux, P. P. & Blenis, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases : a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 320–344 (2004).